
Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin - Schwerpunkt Kardiologie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Maisch)
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Molekularbiologisches Screening des CHRM2-Gens bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Fabian Straulino
aus Darmstadt

Marburg, 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition und Klassifikation der Kardiomyopathien	1
1.2	Dilatative Kardiomyopathie	3
1.2.1	Ätiologie und Prävalenz	3
1.2.2	Pathologie	6
1.2.3	Klinik und Diagnose	6
1.2.4	Klinischer Verlauf und Prognose	8
1.2.5	Therapie	8
1.3	Acetylcholinrezeptoren	10
1.4	CHRM2-Gen	13
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	15
2	Materialien und Methoden	16
2.1	Materialien	16
2.1.1	Chemikalien	16
2.1.2	Verwendete Geräte	16
2.1.3	Ansätze der Puffer	17
2.1.3.1	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)	17
2.1.3.2	SSCP-Loading-Buffer	17
2.2	Methoden	17
2.2.1	Auswahl der Patienten	17
2.2.2	Primerdesign	18
2.2.3	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion	19
2.2.4	Gelelektrophorese	21
2.2.4.1	Agarosegelelektrophorese	22
2.2.4.2	Single-Stranded-Conformation-Polymorphism Gelelektrophorese	22
2.2.5	Aufreinigung und Sequenzierung der auffälligen Proben	24
2.2.6	Untersuchung der Kontrollgruppen	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Ergebnisse labormethodischer Voruntersuchungen	28
3.1.1	PCR	28
3.1.2	SSCP	29

3.2	Untersuchung der Patienten	30
4	Diskussion	38
4.1	Diskussion der molekularbiologischen Methoden	38
4.1.1	Touch-Down-PCR	38
4.1.2	Single-stranded-conformation-polymorphism Gelelektrophorese	39
4.2	Diskussion der Ergebnisse	41
4.2.1	Vergleich des CHRM2-Gens mit anderen Krankheitsgenen der DCM	43
4.2.2	Funktionsdomänen des m2AChR	44
4.2.3	Biochemische Auswirkungen der Mutationen	47
4.2.4	Rolle des m2AChR in der Pathogenese der DCM	48
4.2.5	Vergleich der Ergebnisse mit den Schlussfolgerungen von Zhang et al.	50
5	Zusammenfassung	51
6	Abstract	53

1 Einleitung

1.1 Definition und Klassifikation der Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind Erkrankungen des Herzmuskels mit strukturellen oder funktionellen Veränderungen des Myokards. Eine erste Klassifikation zu dieser sehr heterogenen Gruppe von Erkrankungen verfasste die World Health Organisation (WHO) 1980. Danach sind Kardiomyopathien als Herzmuskelerkrankungen mit unbekannter Ätiologie von Herzmuskelerkrankungen mit bekannter Ätiologie, wie zum Beispiel koronarer Herzerkrankung (KHK) oder arterieller Hypertonie, zu unterscheiden.

In einer überarbeiteten Fassung von 1995 wurden die Herzmuskelerkrankungen, die mit einer kardialen oder systemischen Grunderkrankung einhergehen, als eine Untergruppe der spezifischen Kardiomyopathien in die Definition mit eingeschlossen. Hierzu zählen die ischämische, valvuläre, hypertensive, inflammatorische, metabolische und toxische Kardiomyopathie (Richardson et al. 1996).

Anhand der Morphologie werden bei den Kardiomyopathien fünf Gruppen unterschieden.

- Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist die häufigste Kardiomyopathie. Sie ist charakterisiert durch eine ventrikuläre Dilatation und eine primär systolische Dysfunktion des linken oder beider Ventrikel.
- Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) weist eine meist asymmetrische Hypertrophie des rechten und/oder linken Ventrikels auf, die klassischerweise das interventrikuläre Septum mit einschließt. Klinisch ist hier meist eine diastolische Dysfunktion führend.
- Die restriktive Kardiomyopathie (RCM) ist eine seltene Erkrankung bei der eine gestörte diastolische Füllung bei normaler Myokarddicke zu einer Insuffizienz des Herzens führt.
- Die ebenfalls eher seltene arrhythmogene-rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARCM) ist Ursache von 10-20 % aller plötzlichen Herztodesfälle bei jungen Männern. Neben Arrhythmien ist sie durch eine lipomatöse Degeneration und Dilatation des rechten Ventrikels gekennzeichnet.
- In einer fünften Gruppe sind Kardiomyopathien zusammengefasst, die sich in keine der oben genannten Gruppen einordnen lassen. Hierzu gehören unter anderem die endokardiale Fibroelastose und die linksventrikuläre Non-compaction Kardiomyopathie.

Zur Zeit existieren zwei Klassifikationen zur Kardiomyopathie mit jeweils unterschiedlichen Ansätzen. Die American Heart Association schlug 2006 eine Einteilung in genetische, gemischte und erworbene Kardiomyopathien vor (siehe Abb. 1). Nach dieser Klassifikation zählen auch Ionenkanal-Erkrankungen, trotz Abwesenheit einer strukturellen Veränderung der Herzmuskelzellen, zu den primären Kardiomyopathien. Die DCM wird in dieser Klassifikation den gemischten Erkrankungen zugeordnet, wobei sowohl genetische als auch exogene Faktoren in der Pathogenese eine Rolle spielen können (Maron et al. 2006).

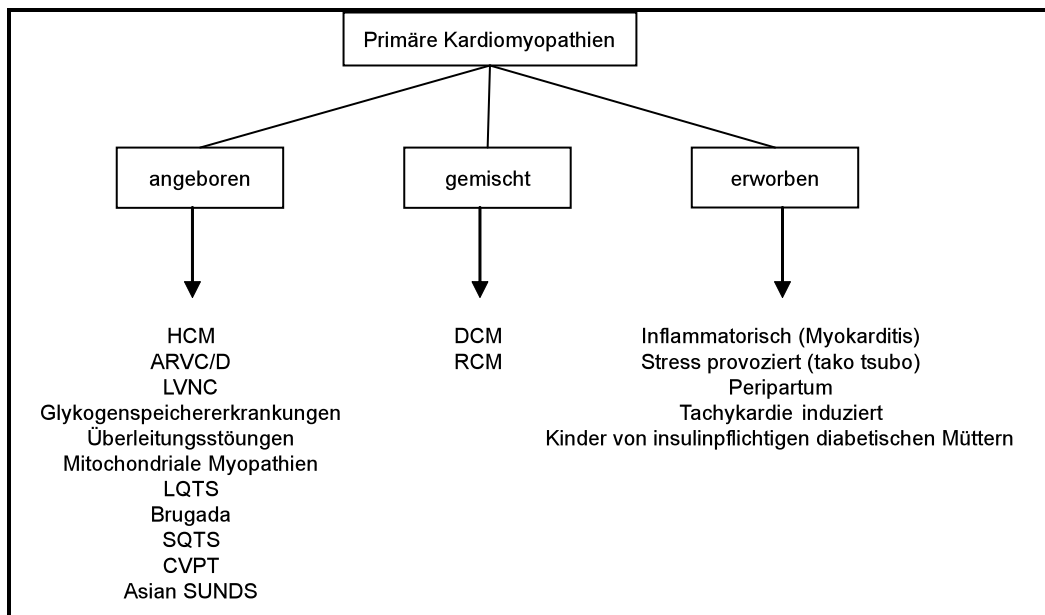


Abb. 1: Klassifikation der Kardiomyopathien nach der American Heart Association.

HCM = hypertrophe Kardiomyopathie. ARVC/D = arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/Dysplasie. LVNC = linksventrikuläre Noncompaction. LQTS = long QT-Syndrom. SQTS = short QT-Syndrom. CVPT = katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie. SUNDS = sudden unexplained nocturnal death Syndrom. DCM = dilatative Kardiomyopathie. RCM = restriktive Kardiomyopathie.

Eine im klinischen Alltag leichter anwendbare Klassifikation publizierte die „working group of myocardial and pericardial diseases“ der European Society of Cardiology im Jahr 2008 (siehe Abb. 2) (Elliot et al. 2008). Die Einteilung der Kardiomyopathien erfolgt dabei analog den 1995 von der WHO vorgeschlagenen morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten, wobei KHK, Hypertonie oder Herzklappenerkrankungen, als Erklärung für die jeweiligen Symptome der Patienten, ausgeschlossen werden müssen. Innerhalb der einzelnen Gruppen wird zusätzlich zwischen familiär bzw. genetisch und nicht-familiär bzw. nicht-genetisch unterschieden.

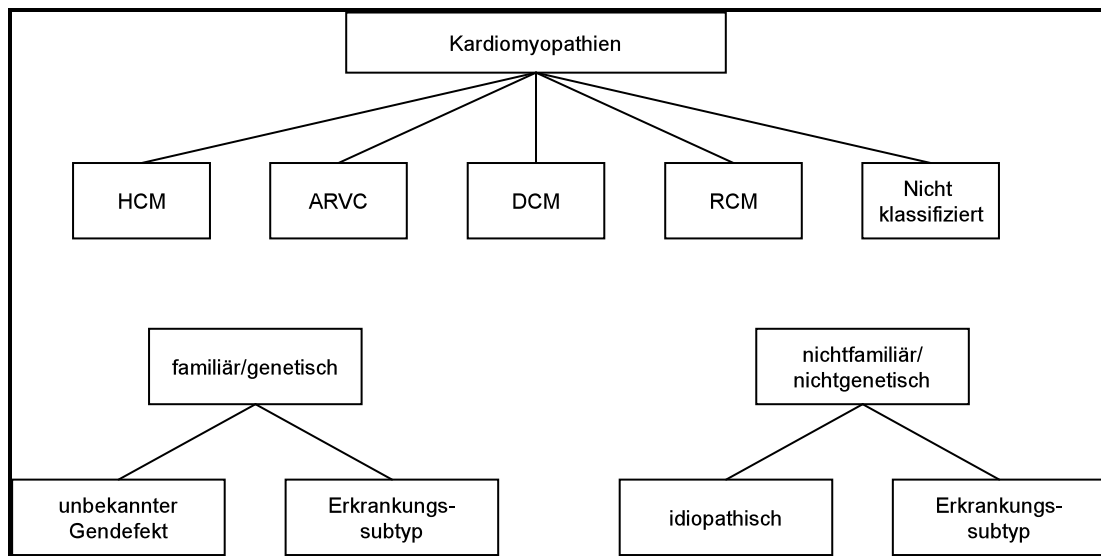


Abb. 2: Klassifikation der Kardiomyopathien nach der European Society of Cardiology.

1.2 Dilatative Kardiomyopathie

1.2.1 Ätiologie und Prävalenz

In Deutschland sterben jährlich über 100.000 Menschen an einem plötzlichen Herzstillstand. Bei etwa einem Drittel aller Fälle wird eine Kardiomyopathie als Ursache angenommen. Mit einer geschätzten Prävalenz von 36 pro 100.000 ist die DCM die häufigste Kardiomyopathie. Die Inzidenz wird mit fünf bis acht Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr angegeben. Unter herztransplantierten Patienten ist die DCM weltweit die führende Grunderkrankung (Paul et al. 2009).

Bei der Mehrzahl der an DCM erkrankten Patienten kann kein auslösender Faktor identifiziert werden. Meist wird ein Zusammenspiel von autoimmunen, infektiösen und genetischen Faktoren als Hauptursache angenommen. Zudem sind autoimmune, infektiöse und genetische Grunderkrankungen bekannt, die für sich allein genommen eine DCM hervorrufen können. Auch einige endokrinologische Erkrankungen oder toxische Noxen können der DCM zugrunde liegen (siehe Tab. 1 nach Hershberger et al. 2010).

Tab. 1: Ätiologie der dilatativen Kardiomyopathie (nach Hershberger 2010).

Ursache	Anteil
Idiopathisch	40 %
Familiär	25 %
Infektiöse	
Myokarditis	11 %
HIV	4 %
Toxisch	
Alkohol	3 %
Anthrazykline	1 %
Cocain	1 %
Infiltrativ	6 %
Amyloidose	
Sarcoidose	
Hämochromatose	
Peripartale DCM	5 %
Kollagenosen	4 %
Endokrine Ursachen	1 %
Hyper-/Hypothyreose	
Phäochromozytom	

Bei 30-50 % aller Patienten mit DCM kann eine virale Infektion, mit oder ohne inflammatorischer Begleitreaktion des Myokards, nachgewiesen werden. Vor allem Adeno- und Enteroviren, aber auch die DNA von Parvoviren B19, Ebstein-Barr-Viren oder Humanen Herpes Viren 6 werden in Myokardbiopsien von Patienten mit DCM molekularbiologisch nachgewiesen (Kühl et al. 2005, Maisch et al. 2003, Pankuweit et al. 2009). Eine chronische myokardiale Virenpersistenz ist dabei mit einer signifikant schlechteren Pumpleistung nach sechs Monaten assoziiert (Kühl et al. 2005).

Aber auch nach der erfolgreichen Elimination der Viren aus dem Herzmuskel kann eine virale Infektion des Herzens weitere Auswirkungen auf den Krankheitsprozess haben. Durch im Rahmen der Infektion stattfindende Immunreaktionen können autoreaktive Immunzellen entstehen. Diese erhalten auch nach der Viruselimination eine chronische Entzündung aufrecht und es kommt zu einer andauernden Gewebeschädigung, welche dann über Jahre zu einer DCM führen kann (Maisch et al. 2005, Pankuweit et al. 2004, Yoshikawa et al. 2009).

Als weiteren Ausdruck der autoimmunen Komponente in der Pathogenese der DCM lassen sich bei mindestens einem Drittel aller Patienten Autoantikörper gegen Strukturen am Herzen finden. Im Vergleich mit gesunden Probanden treten antikardiale Antikörper ausschließlich bei Patienten mit Myokarditis oder DCM vermehrt auf (Caforio et al. 2002, Maisch et al. 1983).

Es wurde beobachtet, dass im Serum von initial antikörper-positiven Patienten mit DCM im Verlauf keine Antikörper mehr nachgewiesen werden konnten. Außerdem haben gesunde antikörper-positive Verwandte von Patienten mit DCM ein signifikant erhöhtes Risiko für die Manifestation einer DCM innerhalb von fünf Jahren. Es ist daher wahrscheinlich, dass antikardiale Antikörper als Marker der frühen DCM dienen können (Caforio et al. 2007).

In der Familienanamnese finden sich bei 20-50 % aller Patienten mit DCM Hinweise auf weitere Erkrankte in der Verwandtschaft (siehe Abb. 3). Sind mindestens zwei Mitglieder einer Familie erkrankt oder ist ein erstgradiger Verwandter unter 35 Jahren plötzlich verstorben, spricht man von einer familiären DCM (Mestroni et al. 1998). Nach den aktuellen Leitlinien sollten bei Patienten mit einer DCM unklarer Ätiologie oder bei Verdacht auf eine familiäre DCM auch asymptomatische Familienmitglieder mittels 12-Kanal-Elektrokardiographie (EKG) und Echokardiographie untersucht werden (Hershberger et al. 2009).

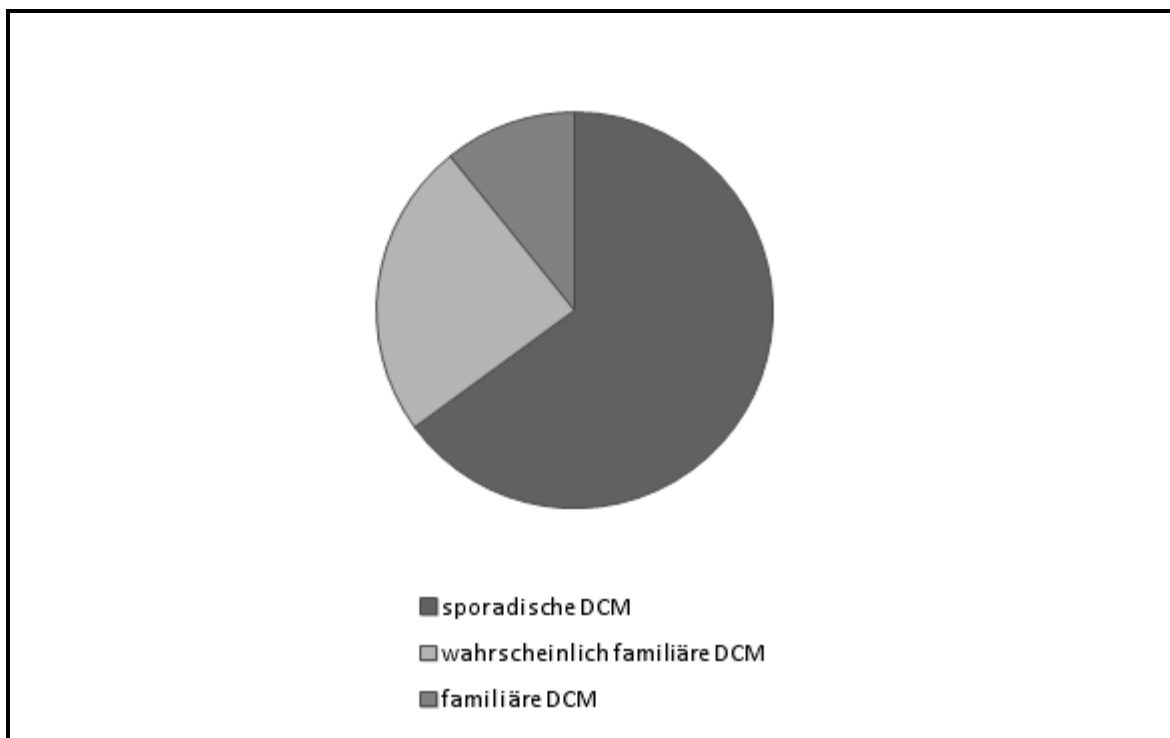


Abb. 3: Prävalenz der familiären DCM (nach Frey et al. 2007).

Bei vielen an DCM erkrankten Patienten finden sich genetische Veränderungen, ohne dass die oben genannten klinischen Kriterien zur Diagnose einer familiären DCM erfüllt sind. In diesen Fällen spricht man von einer genetischen DCM.

Der häufigste Erbgang unter den genetisch bedingten Kardiomyopathien ist in 90 % der Fälle der autosomal-dominante Erbgang. Es sind aber auch x-chromosomale (5-10 %) oder mitochondriale Erbgänge bekannt. Bis heute werden Mutationen in über 30 Krankheitsgenen mit einer DCM in Verbindung gebracht. Es handelt sich dabei zum Großteil um Veränderungen im Sarkomer oder Zytoskelett der Myozyten (Fatkin und Graham 2002).

Aber auch Mutationen in Rezeptorproteinen oder deren Regulatoren können durch ihren Einfluss auf die intrazelluläre Elektrolythomöostase eine DCM hervorrufen. Als gemeinsame Endstrecke aller Mutationen wird eine Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber mechanischem Stress, Apoptose oder degenerativen Veränderungen postuliert (Frey et al. 2007).

Eine genetisch Predisposition für eine DCM führt jedoch nicht zwangsläufig zu einer Manifestation der Erkrankung. Aufgrund dieser klinischen Variabilität und unvollständigen Penetranz der genetischen DCM nimmt man an, dass Umweltfaktoren und bisher nicht identifizierte Gene den Krankheitsverlauf modifizieren. Veränderungen so genannter „Modifier Gene“ führen dabei alleine nicht zu einer DCM, sie können aber für die Entstehung einer DCM prädisponieren und deren Verlauf beeinflussen (Pankuweit et al. 2009).

Obwohl man in den letzten Jahren zahlreiche neue Erkenntnisse über die Pathogenese der DCM gewonnen wurden, kann dennoch bei etwa der Hälfte der Erkrankten keine Ursache für die Erkrankung gefunden werden.

1.2.2 Pathologie

Charakteristisch für das an DCM erkrankte Herz ist die Kardiomegalie. Eine Vergrößerung um das zwei- bis dreifache der Norm ist dabei keine Seltenheit. Mit dem Fortschreiten der Dilatation wird auch die Ausdünnung und Fibrosierung des Myokards makroskopisch sichtbar.

Die histologischen Veränderungen der DCM sind wenig spezifisch. Es zeigen sich hypertrophierte Myozyten mit großen Nucleoli, degenerative Veränderungen an Myozyten und Interstitium. Intrazellulär kann die Anzahl der Myofibrillen vermindert sein. An Orten mit untergegangenem Myokard wird dieses durch Kollagen und Fibrin ersetzt (Luk et al. 2009).

1.2.3 Klinik und Diagnose

Zu Beginn fällt die DCM häufig durch unspezifische Symptome der Linksherzinsuffizienz wie Schwächegefühl oder Leistungsminderung auf. Aber auch Dyspnoe, Tachykardie oder Angina pectoris können Symptome der bestehenden Linksherzinsuffizienz sein.

Entwickelt sich im weiteren Verlauf eine Rechtsherzinsuffizienz sind klinische Zeichen wie gestaute Jugularvenen, prätibiale Ödeme oder eine Hepatomegalie mit Aszites zu beobachten (Bätkler et al. 2009; Maisch et al. 2002).

Die Einteilung der New York Heart Association (NYHA) objektiviert das Ausmaß der Herzinsuffizienz. Je nach Ausprägung der Symptome in Ruhe oder bei Belastung werden die Patienten in vier Schweregrade eingeteilt (siehe Tab. 2 nach The criteria committee of the New York Heart Association 1994).

Tab. 2: Einteilung der subjektiven Beschwerden bei Patienten mit Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association.

Stadium	Klinische Symptome
NYHA I	Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Bei alltäglicher körperlicher Belastung keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
NYHA II	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Bei alltäglicher körperlicher Belastung Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris. z.B. Bergaufgehen oder Treppensteigen.
NYHA III	Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Bei geringer körperlicher Belastung Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris. z.B. Gehen in der Ebene
NYHA IV	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe.

Häufige und bedrohliche Komplikationen der DCM entstehen durch Störungen des Reizleitungssystems oder eine intrakardiale Hämostase.

Bei Dilatation der Ventrikel und einer Reduktion der Ejektionsfraktion (EF) verbleibt endsystolisch ein größeres Blutvolumen im Ventrikel zurück. Die daraus resultierende intrakardiale Hämostase begünstigt die Bildung von intrakardialen Thromben. Kommt es zur Embolisation der Thromben, vor allem in die kranialen Gefäße, gefährdet dies das Leben der Patienten (Diet und Erdmann 2000).

Auch das Reizleitungssystem wird durch die Dilatation des Herzens beeinträchtigt. Bei 30 % aller Patienten mit DCM sind elektrokardiographisch Auffälligkeiten zu finden. Diese reichen von Schenkelblöcken über hämodynamisch irrelevantes Vorhofflimmern bis zu lebensbedrohlichen supraventrikulären und ventrikulären Tachykardien. Wichtig ist, dass kein EKG-Befund beweisend für eine DCM ist. Bei einem unauffälligen EKG-Befund ist eine relevante systolische Funktionseinschränkung unwahrscheinlich, eine DCM jedoch keinesfalls ausgeschlossen (Davie et al. 1996).

Neben der Klinik wird die definitive Diagnose der DCM durch bildgebende Verfahren gestellt. Mittel der Wahl ist hier aufgrund der hohen Verfügbarkeit und der minimalen Risiken für den Patienten zunächst die Echokardiographie. Neben dem Ausmessen der Ventrikelgröße und der Wanddicke des Herzens können zusätzlich die vier Herzklappen auf Insuffizienzen oder Stenosen untersucht werden. Auch eine nicht-invasive Abschätzung der EF ist möglich (Fonesca et al. 2004).

Nach der European Society of Cardiology wird die Diagnose der DCM bei einer EF < 45 % und einem linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) > 117 % gestellt. Um den LVEDD individuell zu adjustieren wird die Henry-Gleichung verwendet, in die neben dem Alter auch die Körperoberfläche (KOF) einfließt (Dickstein et al. 2008; Henry et al. 1980).

$$\text{Henry Gleichung: } \text{LVEDD}_{\text{Adj}} = \text{LVEDD} / 45,3 * \text{KOF}^{1/3} - (0,03 * \text{Alter in Jahren}) - 7,2$$

Um eine KHK auszuschließen und die EF genauer zu bestimmen, gehört auch die Herzkatheteruntersuchung zur weiteren Diagnostik. Bei dieser können zur Klärung der Ätiologie der Erkrankung Myokardbiopsien entnommen und histologisch bzw. molekularbiologisch untersucht werden (Cooper et al. 2007; Karatolios et al. 2007; Pankuweit et al. 2009).

1.2.4 Klinischer Verlauf und Prognose

Die DCM hat einen Manifestationsgipfel zwischen dem vierten und fünften Lebensjahrzehnt. Je nach Ätiologie kann die Erkrankung jedoch auch bereits im Kindesalter auftreten. Männer erkranken etwa dreimal häufiger als Frauen. Auch Menschen mit schwarzer Hautfarbe scheinen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zu haben. Insulinpflichtiger Diabetes mellitus oder auch ein niedriges Einkommen sind ebenfalls mit einem erhöhten Risiko assoziiert (Paul et al. 2009).

Bereits bei Diagnosestellung gibt es unabhängige Prädiktoren, die helfen den weiteren Verlauf der Erkrankung hinsichtlich Tod bzw. einer benötigten Herztransplantation vorherzusagen. Hierzu gehören eine EF < 30 % (Relatives Risiko (RR) 2,25), ein linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) > 15 mmHg (RR 2,0), Alter über 54 Jahre (RR 1,55) und ein Linksschenkelblock im EKG (RR 1,53). Verschlechtert sich bei den Verlaufskontrollen die klinische Symptomatik um mindestens ein NYHA-Stadium (RR 2,6) oder wird eine Mitralinsuffizienz neu diagnostiziert bzw. nimmt der Grad der Insuffizienz zu (RR 1,8), sind dies ebenfalls negative Prädiktoren für den weiteren Verlauf (Grünig et al. 2002).

Der Verlauf der DCM ist in der Regel progressiv, allerdings kommt es bei einem Viertel aller Patienten mit DCM im Verlauf zu einer spontanen Verbesserung der Herzfunktion. Nichts desto trotz ist die Prognose im Allgemeinen schlecht. Die 5-Jahressterblichkeit von bis zu 50 % ist mit der von malignen Erkrankungen vergleichbar. Durch regelmäßige Verlaufskontrollen im Abstand von sechs bis zwölf Monaten kann die ungünstige Prognose etwas verbessert werden (Grünig et al. 2002).

1.2.5 Therapie

Eine spezifische Therapie der DCM ist meist nicht möglich. Die Behandlung erfolgt daher symptomatisch. Zur Basistherapie gehört, neben allgemeinen Maßnahmen wie Einschränkung der Flüssigkeitszufuhr und moderater körperlicher Belastung, vor allem der Einsatz von Medikamenten (Dickstein et al. 2008).

Ziel der medikamentösen Therapie ist es ein Überschießen der Kompensationsmechanismen des Organismus zu verhindern und das Herz zu entlasten. In der Herzinsuffizienztherapie ist eine Senkung der Mortalität ab NYHA I für Hemmer des Angiotensin converting enzymes bzw. Angiotensin1-Antagonisten und nach Myokardinfarkt auch für β -Blocker bewiesen. Ab NYHA III wird nach den aktuellen Leitlinien auch die Gabe eines Aldosteronantagonisten wie Spironolacton zur Verlängerung der Lebenszeit empfohlen (McMurray et al. 2005). Neuere Studien deuten auch für Patienten mit einer milden Herzinsuffizienz im Stadium NYHA II eine Reduktion der Mortalität durch Aldosteronantagonisten an (Zannand et al. 2011).

Keinen Nachweis für eine Senkung der Mortalität gibt es für Diuretika oder Digitalisglykoside. Zur Besserung der Symptomatik oder Herzfunktion sind sie jedoch ebenfalls Bestandteil der Therapie (Faris et al. 2002, the digitalis investigation group 1997).

Bei höhergradigen NYHA Stadien, persistierenden Symptomen trotz pharmakologischer Therapie oder einer EF < 35 % kann bei asynchroner Herzaktion die Implantation eines Zweikammer-Schrittmachers zur Resynchronisation der Herzkammern helfen, die EF der Patienten zu optimieren. Ein implantierbarer Kardioverter/Defibrillator sollte bei Patienten mit höhergradigen Rhythmusstörungen oder einer EF < 35 % in Betracht gezogen werden (Connolly et al. 2000, Riviero-Ayerza et al. 2006).

Bei persistierenden Symptomen der Herzinsuffizienz, trotz maximaler medikamentöser und interventioneller Therapie, mit einem NYHA Stadium III oder IV ist bei fehlenden Kontraindikationen eine Herztransplantation zu überdenken (Dickstein et al. 2008).

Eine therapeutische Sonderstellung nimmt die inflammatorische DCM ein. Abhängig von den Ergebnissen der Myokardbiopsien existieren hier ätiologisch orientierte Therapieansätze. Während Patienten mit nachgewiesener myokardialen Virenpersistenz von einer antiviralen Therapie profitieren, kann bei virusnegativen Patienten bei Nachweis eines immunologischen Entzündungsprozesses mittels Immunsuppression oder Immunabsorption eine klinische Verbesserung erreicht werden. (Felix et al. 2008, Frustaci et al. 2009, Maisch et al. 2004, Schultheiss et al. 2008).

1.3 Acetylcholinrezeptoren

Bei den cholinergen Rezeptoren werden die nicotinerge von den muskarinergen Acetylcholinrezeptoren unterschieden. Beide Arten von Rezeptoren werden durch Acetylcholin aktiviert, besitzen aber mit Nikotin bzw. Muskarin unterschiedliche weitere Agonisten.

Die nicotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) befinden sich an den motorischen Endplatten, präganglionär im autonomen Nervensystem und im zentralen Nervensystem (ZNS). Die fünf Untereinheiten des Rezeptorproteins bilden einen transmembranären Ionenkanal. Eine Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Öffnung des Ionenkanals und durch den Einstrom von Kationen nach intrazellulär zu einer Depolarisation und Erregung der Zelle (Silbernagel et al. 2007).

Die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) hingegen befinden sich postganglionär in parasympathischen Nerven, präsynaptisch als Autorezeptoren und im ZNS. Die Mehrheit der Effekte des Parasympathikus im ZNS und in der Peripherie wird über sie vermittelt (Dhein et al. 2001).

Im Gegensatz zu den nAChR gehören die mAChR zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie besitzen sieben Transmembrandomänen sowie einen extrazellulären N-Terminus und ein intrazelluläres c-terminales Ende. Die Sekundärstruktur des Rezeptorproteins wird dabei durch sieben α -Helices gebildet, die eng aneinander v-förmig in der Zellmembran angeordnet sind. Innerhalb der Zellmembran können mAChR unterschiedliche Konformationen einnehmen und so die weitere Signaltransduktion einleiten (Caulfield und Birdsdales 1998).

Für die Bindung der Liganden existieren bei den mAChR zwei Interaktionsdomänen. Zum einen die orthotope Bindestelle des Acetylcholins, zum anderen eine weitere Domäne, die so genannte allosterische Bindestelle.

Die Bindung eines Agonisten führt zunächst zu einer Konformationsänderung des Rezeptors in einen Zustand, der die Interaktion mit dem jeweiligen G-Protein erleichtert. Das extrazelluläre Signal wird so nach intrazellulär weitergeleitet. An der α -Untereinheit des G-Proteins kommt es zu einem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP). Das G-Protein zerfällt in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die weitere Signaltransduktion wird anschließend durch den Einfluss von Second-messenger-Botenstoffen vermittelt (Mosser et al. 2001).

Bei Säugetieren sind fünf verschiedene Subtypen der mAChR (M1 bis M5) bekannt (siehe Tab. 3). Die Subtypen M1, M3 und M5 vermitteln über die α -Untereinheit eines G_q -Proteins eine Aktivierung der Phospholipase C. Diese spaltet Phosphatidylinositol-4, 5-bis-phosphat (PIP_2) in Inositol-1, 4, 5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 und DAG vermitteln als Second-messenger die weiteren Effekte. Die Subtypen M2 und M4 hingegen hemmen über ein G_i -Protein die Adenylatcyclase und senken so die intrazelluläre Konzentration des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) (van Koppen und Kaiser 2003).

Tab. 3: Subtypen der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (nach Dhein et al. 2001).

	M1	M2	M3	M4	M5
Chromosom	11q12-13	7q35-36	1q43-44	11p12-11.2	15q26
Aminosäuren	460	466	590	479	532
G-Protein	$q/11$	i/o	$q/11$	i/o	$q/11$
Second messenger	PLC IP_3 /DAG Ca^{2+} /PKC	AC↓	PLC IP_3 /DAG Ca^{2+} /PKC	AC↓	PLC IP_3 /DAG Ca^{2+} /PKC
Lokalisation	Gehirn Exokrine Drüsen sympathische Ganglien	Herz Mesencephalon Ileum	Gehirn Exokrine Drüsen glatte Muskulatur Endothelzellen	Frontalhirn Striatum	Substantia nigra

AC = Adenylatcyclase. Ca^{2+} = Calcium. DAG = Diacylglycerin. IP_3 = Inositoltrisphosphat. PKC = Proteinkinase C. PLC = Phospholipase C.

Am Herzen ist der m2AChR der vorherrschende muskarinerge Rezeptor. Eine Stimulation hat einen negativ chronotropen und inotropen Effekt. Durch die G_i -Protein vermittelte Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration wird die Aktivierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle an der Zellmembran gehemmt und so der Calciumeinstrom in die Zelle reduziert. Wie bei anderen Muskeln führt auch am Myokard eine Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer negativen Inotropie. Daneben werden nach Aktivierung der m2AChR hauptsächlich am Vorhof K^+ -Einwärtsgleichrichter-Kanäle geöffnet. Dies führt über eine Hyperpolarisation der Zellmembran zu einer Senkung der Herzfrequenz und Verkürzung des Aktionspotentials. Unklar ist die Rolle einer Aktivierung der NO-Synthase am Herzen durch den m2AChR. Sie könnte über eine Erhöhung des intrazellulären zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) ebenfalls zu einer Hemmung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle führen (siehe Abb. 4 nach Dhein et al. 2001, Pan et al. 2008).

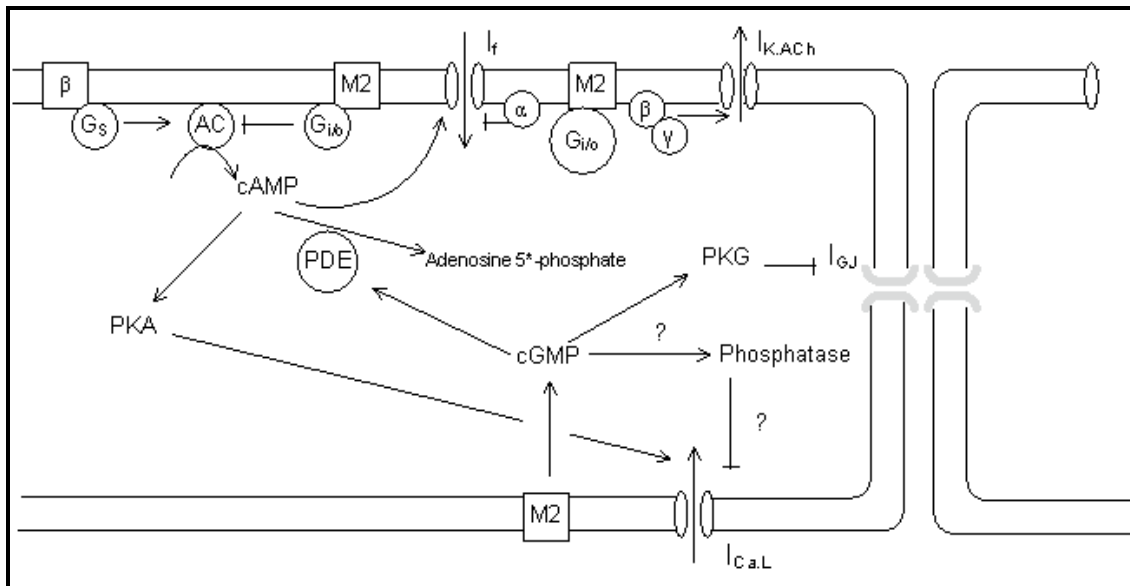


Abb. 4: Signaltransduktion des m2AChR (nach Dhein et al. 2001).

AC = Adenylatcyclase. β = β -Adrenorezeptor. I_{CaL} = L-Typ Calciumkanal. I_f = Schrittmacherkanal. I_{KACh} = K^+ -Einwärtsgleichrichterkanal. M2 = m2AChR. PDE = Phosphodiesterase. PKA = Proteinkinase A. PKG = Proteinkinase G.

Wie bei der Mehrzahl der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren kommt es auch bei den m2AChR bei persistierender Stimulation zu einer Reduktion der intrinsischen Aktivität des Rezeptors und durch Internalisierung zu einer reduzierten Rezeptordichte an der Zellmembran.

Sowohl bei der Desensibilisierung als auch bei der Internalisierung kommt dem intrazellulären Protein β -Arrestin eine zentrale Rolle zu. Nach einer agonistenabhängigen Phosphorylierung des Rezeptorproteins durch die G-Protein-gekoppelte-Rezeptorkinase kann Arrestin an den m2AChR binden und ihn von seinem G-Protein entkoppeln bzw. die Endozytose des Rezeptors einleiten (Paals-Rylaarsdam et al. 1997, van Koppen und Kaiser 2003).

Lange Zeit wurde angenommen, dass der m2AChR der einzige mAChR am Herzen ist. Die Beobachtung, dass eine über das physiologische Maß hinausgehende Konzentration von muskarinergen Agonisten über eine IP_3 -Erhöhung einen positiven inotropen und chronotropen Effekt am Herzen hat, ließ aber vermuten, dass noch ein zweiter mAChR Subtyp am Herzen existiert. Tatsächlich gibt es nach heutigem Kenntnisstand neben dem vorherrschenden m2AChR auch m3AChR am Herzen. Die physiologische Rolle der kardialen m3AChR ist allerdings noch nicht geklärt (Willmy-Matthes et al. 2003; Wang et al. 2004).

1.4 CHRM2-Gen

Das CHRM2-Gen befindet sich im menschlichen Genom auf Chromosom 7_{q31-q35} und umfasst 151,65 kbp. Es besteht aus drei Exons, wobei lediglich das letzte die Informationen für ein Protein beinhaltet. Mindestens zwölf verschiedene Splicevarianten der mRNA existieren, davon kodieren zehn für einen intakten m2AChR. Die kodierende Sequenz des m2AChR umfasst 1401bp und zeigt in 94-100 % eine Übereinstimmung im Vergleich des Menschen mit anderen Säugetieren (Badner et al. 1995; Zhou et al. 2001).

In der Vergangenheit wurden Polymorphismen des CHRM2-Gens mit einigen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht (siehe Tab. 4).

Bisher eindeutige und auch reproduzierte Daten zeigen einen Zusammenhang zwischen Single-nucleotid-Polymorphismen (SNPs) des CHRM2-Gens und dem Auftreten von Alkohol- und Drogenabhängigkeit (Luo et al. 2005; Dick et al. 2007).

Im Bezug auf die Major Depression ist die Studienlage weniger eindeutig. In der Vergangenheit haben einige Studien einen Bezug von SNPs im CHRM2-Gen und der Major Depression herstellen können (Comings et al. 2002). Eine 2009 publizierte große Fall-Kontroll-Studie mit 1420 Fällen und 1624 Kontrollen konnte diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen (Cohen-Woods et al. 2009).

Ähnliche Daten liegen auch für einen Zusammenhang von Veränderungen im CHRM2-Gen und einem erhöhten Intelligenzquotienten vor. Mehrere Arbeiten konnten in der Vergangenheit einen signifikant erhöhten Intelligenzquotient bei Probanden mit SNPs im CHRM2-Gen feststellen (Comings et al. 2003; Gosso et al. 2006; Dick et al. 2007). Im Gegensatz dazu steht die größte Studie zu diesem Thema aus dem Jahr 2009 mit insgesamt über 3300 Probanden in drei unabhängigen Kohorten. Bei 30 untersuchten SNPs konnten hier keine signifikanten Unterschiede zwischen Trägern und Nicht-Trägern der Polymorphismen im CHRM2-Gen gezeigt werden (Lind et al. 2009).

Eine Assoziation zwischen Nikotinabusus und dem SNP rs324650 wurde in einer Publikation beschrieben. Diese war allerdings nur bei Frauen signifikant (Mobascher et al. 2009). Auch eine Assoziation zwischen SNPs im CHRM2-Gen und einigen Charaktereigenschaften, wie Freundlichkeit oder ein reduziertes Pflichtbewusstsein, wurden in der Vergangenheit beobachtet (Luo 2007).

Da der m2AChR der vorherrschende mAChR am Herzen ist und ihm eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Herzfunktion zukommt, liegt ein Einfluss von Veränderungen im CHRM2-Gen auf kardiale Erkrankungen nahe. Bis heute wurden drei Studien publiziert, die eine Verbindung des CHRM2-Gens mit kardiologischen Erkrankungen herstellen.

Zwei Studien von Hautale et al. beschäftigen sich mit der Erholungsrate der Herzfrequenz nach Belastung bei Probanden mit SNPs im CHRM2-Gen. In einer ersten Arbeit wurden gesunde Probanden untersucht und in einer folgenden Arbeit Patienten mit kürzlich stattgehabten Myokardinfarkt. In beiden Studien zeigten die Träger zweier SNPs eine geringere Erholung der Herzfrequenz nach Belastung. Bei den Patienten mit kürzlich stattgehabten Myokardinfarkt war das Auftreten beider SNPs mit einer erhöhten Mortalität verbunden (RR 2,5 bzw. 2,1).

Tab. 4: Datenlage zur Assoziation von Veränderungen im CHRM2-Gen mit klinischen Erscheinungen.

Klinik	Zusammenhang		
	Ja	Unklar	Nein
Alkoholabusus	X		
Drogenabusus	X		
Nikotinabusus	(X)		
Major Depression		X	
Intelligenzquotient		X	
Charaktereigenschaften	X		
Kardiale Erholungsrate	X		
Asthma bronchiale			X

Zhang et al. untersuchten die kodierende Region auf dem dritten Exon des CHRM2-Gens von sieben nicht miteinander verwandten Familien mit einer familiären Form der DCM. Der für den m2AChR kodierende Abschnitt des CHRM2-Gens wurde sequenziert und das Blut der Patienten mittels ELISA auf Autoantikörper gegen den m2AChR getestet. Als Vergleichsgruppe wurden weitere 139 Patienten mit sporadischer DCM und 450 gesunde Probanden untersucht.

Bei einer Familie fand sich bei allen zwölf Erkrankten die Missense-Mutation C722G. Diese führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 176 des Rezeptorproteins von Cystein zu Tryptophan in der zweiten extrazellulären Schleife des m2AChR.

Weder bei den gesunden Mitgliedern dieser Familie, noch bei den an DCM erkrankten Patienten der sechs übrigen Familien oder den 139 Patienten mit sporadischer DCM konnte diese oder eine andere Mutation im CHRM2-Gen gefunden werden. Auch unter den 450 gesunden Probanden fanden sich keine Mutationen.

Alle Träger der Mutation waren im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) positiv für Autoantikörper gegen den m2AChR. Sie zeigten einen früheren Krankheitsbeginn und eine statistisch signifikant höhere 3-Jahres-Sterblichkeit. Die Autoren vermuten, dass der m2AChR eine wichtige Rolle bei strukturellen und funktionellen Veränderungen des Herzens spielt. Die gefundene Mutation könnte eine Rolle in der Entstehung der DCM spielen oder als Prädiktor für deren Verlauf dienen.

Dies ist bis heute die einzige Studie, die eine Mutation der kodierenden Region des CHRM2-Gens mit einer Erkrankung in Verbindung bringt. Andere Untersuchungen der kodierenden Region bei Patienten mit Asthma bronchiale zeigten keine Mutationen.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die dilatative Kardiomyopathie ist die häufigste Kardiomyopathie. Sie ist weltweit die führende Indikation für eine Herztransplantation. Bei mindestens 30 % aller Patienten mit DCM wird eine genetische Komponente in der Pathogenese der Erkrankung angenommen. Die Vielzahl an bekannten Krankheitsgenen zeigt dabei die große genetische Heterogenität der Erkrankung (Frey et al. 2007).

Ein neues mögliches Krankheitsgen der DCM ist das für den m2AChR kodierende CHRM2-Gen. Eine Hauptaufgabe des m2AChR besteht in der Regulation der parasymphatischen Innervation am Herzen. In der Vergangenheit konnten bei 30-50 % der Patienten mit DCM Autoantikörper gegen m2AChR nachgewiesen werden (Caforio et al. 2002).

Im Jahr 2008 wurde von Zhang et al. erstmals über eine Mutation im für den m2AChR kodierenden dritten Exon des CHRM2-Gens berichtet, die möglicherweise mit der Entstehung einer DCM in Zusammenhang steht und deren Krankheitsverlauf negativ beeinflusst.

Um die Bedeutung des CHRM2-Gens für die Pathogenese der DCM weiter zu untersuchen, soll im Rahmen dieser Arbeit eine molekularbiologische Untersuchung der kodierenden Region des CHRM2-Gens bei Patienten mit DCM durchgeführt werden. Als Methode wird die Polymerase-Kettenreaktion mit anschließender single-stranded-conformation-polymorphism Gelelektrophorese verwendet.

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Mutationen im CHRM2-Gen als Hinweise für die Rolle des Gens in der Pathogenese der DCM zu identifizieren. Diese Mutationen im CHRM2-Gen sollen mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen werden. Bei Mutationsträgern soll anhand der vorliegenden klinischen Daten versucht werden, einen Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung herzustellen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tab. 5: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Firma	
Agarose	Biozyme	Wien, Österreich
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio Rad	München
Borsäure	Fisher Scientific	Schwerte
dNTP's	Bioline	Luckenwalde
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Acros organics	Geel, Belgien
Ethidiumbromid	Carl Roth	Karlsruhe
Formamid	Carl Roth	Karlsruhe
Längenstandard (100bp)	Bioline	Luckenwalde
Loading-Buffer	5 Prime	Hamburg
NH ₄ -Puffer (10x)	Bioline	Luckenwalde
MgCl ₂	Bioline	Luckenwalde
Primer	TIB Molbiol	Berlin
Rotiphorese 40 (37,5:1)	Carl Roth	Karlsruhe
Taq-Polymerase	Bioline	Luckenwalde
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Acros organics	Geel, Belgien
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	Acros organics	Geel, Belgien

2.1.2 Verwendete Geräte

Tab. 6: Verzeichnis der verwendeten Geräte.

Geräte	Firma	
Thermocycler:		
Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystem	Darmstadt
Primus 65 Plus	MWG Biotech	Eberberg
Elektrophoresekammer		
GNA 100	Pharmacia Biotech	Uppsala, Schweden
Maxigel	Biometra	Göttingen
Stromquellen		
Power Pack P25	Biometra	Göttingen
E 452	Consort nv	Turnhout, Belgien
CCD-Kamera	Bio Rad	München

2.1.3 Ansätze der Puffer

2.1.3.1 Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

1	Mol Tris(hydroxymethyl)aminomethane	→ 121,14 g
0,9	Mol Borsäure	→ 55,65 g
0,01	Mol EDTA	→ 3,72 g

Die oben genannten Chemikalien werden in etwa 800ml H₂O gelöst und der Ziel-pH von 8,4 eingestellt. Danach wird der Puffer mit H₂O auf einen Liter aufgefüllt.

2.1.3.2 SSCP-Loading-Buffer

95	% Formamid
0,05	% Xylene Cyanol
0,05	% Bromphenolblau
10	mM NaOH

2.2 Methoden

2.2.1 Auswahl der Patienten

Im Rahmen des Teilprojekts 9a des Kompetenznetz Herzinsuffizienz (KNHI) wurden von über 300 Patienten mit DCM Vollblutproben in eine Biomaterialbank aufgenommen und deren klinische Daten prospektiv in einer standardisierten klinischen Datenbank erfasst. Die Blutproben der in dieser Arbeit untersuchten Patienten sind Teil dieser Biomaterialbank.

Das KNHI ist ein vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördertes Kooperationsnetzwerk von wissenschaftlichen Arbeitsgruppen aus dem gesamten Bundesgebiet mit dem Ziel, die Effizienz und Effektivität der Forschung im Bereich der Herzinsuffizienz zu steigern und eine Verbesserung der klinischen Versorgung zu erreichen.

Die verschiedenen Forschungsbereiche des KNHI sind in 13 wissenschaftliche Teilprojekte unterteilt. Hierbei hat das von der Klinik für Kardiologie in Marburg initiierte Teilprojekt 9a die Untersuchung ätiopathogenetisch bedeutsamer Faktoren der DCM zum Ziel. Insbesondere eine genetische Assoziation von Autoimmun- und Infektionserkrankungen in der Pathogenese der DCM soll untersucht werden (www.knhi.de).

Einschlusskriterien für alle Patienten, deren Daten im Rahmen des KNHI Teilprojektes 9a aufgenommen wurden, sind, den aktuellen Leitlinien der European Society of Cardiology entsprechend, eine EF < 45 % und ein LVEDD > 117 % nach dem Henry-Index.

Die Patienten gaben nach Aufklärung schriftlich ihr Einverständnis zur Aufnahme ihrer Daten in die Datenbank des KNHI und willigten in die Verwendung der Daten und DNA zu Forschungszwecken ein. Das Ethikvotum der zuständigen Ethikkommissionen liegt vor.

Alle Patienten wurden bei Einschluss gebeten, einen standardisierten Fragebogen auszufüllen. Blut wurde entnommen, die DNA extrahiert und tiefgefroren. Eine klinische Untersuchung inklusive Echokardiographie vervollständigte die gewonnenen Daten. Ein Jahr nach Einschluss in das KNHI erfolgte eine erneute klinische Untersuchung. Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen, wie zum Beispiel der Myokardbiopsieuntersuchungen, wurden ebenfalls erfasst und liegen vor.

2.2.2 Primerdesign

Um die kodierende Region im CHRM2-Gen amplifizieren zu können wurden Primer entworfen, die den entsprechenden DNA-Abschnitt im CHRM2-Gen vollständig erfassen. Für eine hohe Sensitivität der single-stranded-conformation-polymorphism Gelelektrophorese (SSCP) sollten die Produkte der Polymerasekettenreaktion (PCR) eine Länge von 400bp nicht überschreiten (Sheffield et al. 1993). Daher wurden für die 1401bp umfassende kodierende Region des CHRM2-Gens acht Primerpaare verwendet. Jedes Primerpaar schließt einen 270 bis 305 Basenpaare umfassenden Teil der kodierenden Region des CHRM2-Gens ein. Die einzelnen Abschnitte überlappen sich um 98 bis 125 Basenpaare. Das Amplifikat des achten Primerpaars geht 74 Basenpaare über die kodierende Region des Gens hinaus (siehe Tab. 7). Die Primer wurden mit Hilfe des Programmes „Gene Sorter“ der University of California Santa Cruz entworfen und von der Firma TIB MOLBIOL® synthetisiert.

Tab. 7: Primerpaare

Primersequenz	Amplifikatlänge	Überlappung
CHRM2 3-1F 5'-TTCTATTTCTTGCAGGTTAAATG-3' CHRM2 3-1R 5'-TGTACAAGTTCATGGAGAAAACAC-3'	303bp	
CHRM2 3-2F 5'-CGGGAACATCCTAGTCATGG-3' CHRM2 3-2R 5'-CGCTTGACTGGGTAGGTCAG-3'	288bp	125bp
CHRM2 3-3F 5'-GCTAGCCCTGGACTATGTGG-3' CHRM2 3-3R 5'-AGCCGTACCAAAGGTGACAG-3'	277bp	102bp
CHRM2 3-4F 5'-GCTCCAGCCATTCTTCTG-3' CHRM2 3-4R 5'-TGCTGGGCATGTTGTTATTG-3'	286bp	109bp
CHRM2 3-5F 5'-GAAGGACAAGAAGGAGCCTG-3' CHRM2 3-5R 5'-CCAGGGAAGTGGAACTGTG-3'	284bp	98bp
CHRM2 3-6F 5'-TGTTCAAGGAGAGGAGAAGG-3' CHRM2 3-6R 5'-TCATCTTCACAATCTTGCGG-3'	284bp	116bp
CHRM2 3-7F 5'-AAAAGTGACTCATGTACCCCAAC-3' CHRM2 3-7R 5'-CAAAGCCAGTAACCAATTGTCC-3'	290bp	109bp
CHRM2 3-8F: 5'-CAATCTTGGCTATTCTGTTGG-3' CHRM2 3-8R: 5'-GCTCGTTATCCCTTTTATTCTTC-3'	305bp	124bp

2.2.3 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine In-vitro-Technik, mit der gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigt werden können. Das Prinzip besteht aus mehreren Amplifikationszyklen mit den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Amplifikation. Während einer PCR wird dieser Zyklus in der Regel ca. 30-40 Mal wiederholt (Mullis et al. 1986).

Im ersten Schritt kommt es durch Erhitzen zu einer Trennung der beiden Stränge des DNA-Moleküls. Im zweiten Schritt lagern sich, nach Abkühlen der Reaktion, zwei hinzugegebene spezifische Oligonukleotide, so genannte Primer, an die Einzelstrang DNA (ssDNA) an. Sie begrenzen so den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt. In einem dritten Schritt werden die Primer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) verlängert. Die hierfür verwendete Taq-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* und ist, im Gegensatz zu der Polymerase des Menschen, hitzestabil (Carballeira et al. 1990, Clarke et al. 1992).

Das Reaktionsgemisch wird in ein dünnwandiges Reaktionsgefäß, zum Beispiel eine 96-Well-Platte, gegeben. Die jeweils benötigte Temperatur der Reaktionsmischung wird durch Erwärmen bzw. Abkühlen in einem Thermocycler erreicht.

Bereits nach dem dritten Zyklus bilden sich Doppelstränge, die der durch die Primer eingerahmten DNA-Sequenz entsprechen. Durch die weiteren Zyklen vermehrt sich das gewünschte Amplifikat exponentiell. Nach Abschluss der PCR werden die Proben bei 4° Celsius gelagert. Die Taq-Polymerase zeigt bei dieser Temperatur keine Aktivität und das Amplifikat bleibt stabil.

Für die PCR werden pro Probe 25 ng DNA in einem 12,5 µl PCR-Ansatz verwendet.

Der PCR-Ansatz wird folgendermaßen zusammengestellt:

Forward Primer (5 µM):	0,5 µl
Reverse Primer (5 µM):	0,5 µl
10x NH ₄ -Puffer:	1,25 µl
dNTP's (2,5 mM):	1 µl
MgCl ₂ (50 mM):	0,5 µl
H ₂ O:	8,185 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl):	0,065 µl

Je 25 ng DNA werden in jedes Well einer 96-Well-Platte vorgelegt. Um eine vorzeitige Aktivität der Taq-Polymerase zu vermeiden, wird diese erst nach dem Vorlegen der DNA in den PCR-Ansatz hinzugegeben. Anschließend werden zu jeder Probe 12 µl PCR-Ansatz gegeben und die PCR-Platte kurz zentrifugiert.

Die 96-Well-Platte wird in den Thermocycler gegeben und eine Touch-Down-PCR durchgeführt. Dabei wird die Annealingtemperatur zunächst oberhalb der Schmelztemperatur der Primer gewählt und anschließend schrittweise bis unterhalb der zu erwartenden Schmelztemperatur reduziert. Je niedriger die Annealingtemperatur, umso mehr Zyklen werden mit dieser Temperatur durchgeführt. Bei einer hohen Annealingtemperatur binden die Primer spezifischer an die komplementäre DNA-Sequenz. Dadurch wird die Bildung von Artefakten vermindert und vorzugsweise der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert (siehe Tab. 8, Korbie und Mattick 2008).

Tab. 8: Programm und Prinzip der PCR

Anzahl	Zyklus	Temperatur	Zeit
1	Denaturieren	95°	5min
3	Denaturieren	95°	30sec
	Annealing	68°	30sec
	Elongation	72°	45sec
3	Denaturieren	95°	30sec
	Annealing	65°	30sec
	Elongation	72°	45sec
4	Denaturieren	95°	30sec
	Annealing	63°	30sec
	Elongation	72°	45sec
6	Denaturieren	95°	30sec
	Annealing	61°	30sec
	Elongation	72°	45sec
6	Denaturieren	95°	30sec
	Annealing	58°	30sec
	Elongation	72°	45sec
15	Denaturieren	95°	30sec
	Annealing	55°	30sec
	Elongation	72°	45sec
1	Hold	72°	∞

2.2.4 Gelelektrophorese

Bei einem pH-Wert um 7,5 sind DNA-Moleküle insgesamt negativ geladen und bewegen sich in einem angelegten elektrischen Feld zur Anode. Bei den Gelelektrophoresen macht man sich dies zu Nutze, indem man DNA auf ein Agarose- oder Polyacrylamidgel aufträgt und deren Laufverhalten im elektrischen Feld beurteilt. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel ist dabei von Molekulargewicht und Konformation der DNA sowie Konzentration bzw. Porengröße des Gels und angelegter Spannung abhängig. Unterschiede im Laufverhalten von Proben geben demnach, je nach Art des Gels, Hinweise auf Unterschiede in der Länge oder Konformation des Amplifikats. In dieser Arbeit werden Agarose- und Polyacrylamidgele verwendet.

Sichtbar gemacht wird das Ergebnis der Gelelektrophorese durch Anfärbung mit Ethidiumbromid. Ethidiumbromid interkaliert mit DNA und zeigt unter UV-Licht eine starke Fluoreszenz. Die DNA in den Gelen kann so mit Hilfe einer CCD-Kamera sichtbar gemacht und beurteilt werden (Alberts et al. 2011, Kohlmann und Rhöm 2002).

2.2.4.1 Agarosegelelektrophorese

Das Agarosegel ist in erster Linie für Längenbestimmungen von DNA-Fragmenten geeignet. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA im Gel ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Somit kann das Molekulargewicht eines DNA-Fragmentes mit unbekannter Größe aus seiner Wanderstrecke im Gel bestimmt werden. Voraussetzung ist allerdings ein Längenstandard, der neben den DNA-Fragmenten auf das Gel aufgetragen wird. Der als Längenstandard verwendete Marker enthält DNA-Fragmente definierter Größe, so dass bei der Auswertung im Agarosegel alle 100bp eine Markierung sichtbar wird (Alberts et al. 2011, Mülhardt 2009).

Bei dieser Arbeit werden 1,5%ige horizontale Agarosegele für die stichprobenartige Erfolgskontrolle der PCR verwendet.

Für die Herstellung eines 1,5%igen Agarosegels mit einem Volumen von 50 ml werden 0,75 g Agarose in 50 ml 0,5xTBE-Buffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen unter Rühren auf ca. 60° Celsius werden 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und die Lösung zum Aushärten in eine Form gegossen. Kämme werden in das noch flüssige Gel als Platzhalter für die Taschen eingesetzt.

Nach dem Aushärten des Gels wird dieses in einer Gelkammer mit 0,5xTBE-Puffer überschichtet. Um den Erfolg der PCR zu kontrollieren, wird mit zehn repräsentativen Proben pro 96-Well Platte eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Je 2,5 µl der PCR-Produkte werden mit 2 µl eines Loading-Buffers gemischt und neben dem Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Der Loading-Buffer erhöht zum einen die Dichte des PCR-Produktes, so dass es auf den Boden der Geltaschen sinkt. Zum anderen ist es durch den im Loading-Buffer enthaltenen Farbstoff möglich, die Wanderstrecke der Amplifikate während der Elektrophorese zu überwachen.

Eine Spannung von 80 V wird für etwa 60 min an die Gelkammer angelegt. Beim Durchwandern des Gels interkaliert die DNA mit dem im Gel vorhandenen Ethidiumbromid und wird dadurch, bei der Auswertung, unter UV-Belichtung sichtbar.

2.2.4.2 Single-Stranded-Conformation-Polymorphism Gelelektrophorese

Als molekularbiologische Methode für die Suche nach Mutationen im CHRM2-Gen wird die single-stranded-conformation-polymorphism Gelelektrophorese (SSCP) verwendet.

Die SSCP ist eine relativ einfache und sensitive molekularbiologische Methode, um zuvor unbekannte Mutationen in einem PCR-Amplifikat zu identifizieren. Sie wurde erstmals von Orita im Jahr 1989 beschrieben und in den folgenden Jahren weiter entwickelt (Konstantinos et al. 2008).

Die SSCP beruht auf dem Prinzip, dass in ihre Einzelstrangform überführte DNA eine durch die Primärsequenz bestimmte einzigartige Sekundärstruktur einnimmt. Diese wird durch intramolekulare Interaktionen stabilisiert und führt zu Veränderungen des Laufverhaltens im nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel. Dabei führen bereits Punktmutationen in einem einige hundert Basenpaare umfassenden Fragment zu detektierbaren Mobilitätsunterschieden (Orita et al. 1989).

Um eine geeignete Laufzeit für die SSCP zu ermitteln, wird vor Beginn der Untersuchung der Patientenproben ein Laufzeittest durchgeführt. Bei einer SSCP über fünf Stunden bei 300 V wird hierbei alle 30 min je eine Geltasche des Polyacrylamidgels mit jeweils dem gleichen Amplifikat beladen. Die Laufzeit der Bande mit der besten Auftrennung der Probe wird für die folgende Untersuchung der Patientenproben verwendet. Zur Ermittlung der optimalen Polyacrylamidkonzentration der Gele werden Gele mit 5 %, 7 % und 10 % Polyacrylamid getestet.

Vor dem Gießen der Polyacrylamidgele werden zunächst zwei Glasplatten mit H₂O und Ethanol gereinigt. Zwischen die Ränder der gereinigten Platten wird ein Gummi als Abstandhalter und Abdichtung eingesetzt. Klammern dienen als Fixierung der Platten aneinander.

Für ein 7%iges Gel werden 7 ml 40%iges Acrylamid (Rotiphorese 40) mit 4 ml 10xTBE-Puffer und 29 ml H₂O gemischt. Nach der Zugabe von 360 µl 10%igem APS als Polymerisationsstarter und 36 µl TEMED als Katalysator beginnt die Polymerisation des Gels. Das noch flüssige Gel wird zwischen die vorbereiteten Platten gegossen und ein Kamm mit 32 Zähnen als Platzhalter für die Geltaschen eingesetzt.

Nach etwa zwei Stunden ist das Gel vollständig polymerisiert und kann verwendet werden. Der Kamm wird entfernt und die Geltaschen werden gereinigt. Nachdem zwei Gele vertikal in die Elektrophoresekammer eingespannt wurden, wird diese mit 1xTBE-Puffer gefüllt und die Dichtigkeit der Kammer überprüft. Um ein über das Gel konstantes elektrisches Feld zu gewährleisten, müssen Luftblasen am Boden des Gels ausgespült werden.

Die PCR-Produkte werden zur Vorbereitung auf die SSCP zunächst mit einem denaturierendem Puffer im Verhältnis von 1:1 versetzt. Danach werden die Proben durch Erhitzen auf 95° Celsius für 5 min denaturiert. Durch sofortiges Kühlen auf Eis wird die Sekundärstruktur der ssDNA stabilisiert. Pro Geltasche werden 6 µl des PCR-Gemisches auf das Polyacrylamidgel gegeben.

Nach der SSCP werden die Gele für drei Minuten in ein Ethidiumbromidbad gegeben. Im Ethidiumbromidbad interkaliert das Ethidiumbromid mit der im Gel vorhandenen DNA. Durch anschließendes Entfärben des Gels in Wasser bleibt lediglich das an die DNA gebundene Ethidiumbromid im Gel zurück und die DNA-Banden können unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Bei identischer Basensequenz sollten die aufgetragenen Proben ein einheitliches Laufverhalten zeigen. Zeigt eine Probe ein abweichendes Laufverhalten, muss ihre Basensequenz mittels Sequenzierung bestimmt werden, um eine mögliche Mutation zu identifizieren.

2.2.5 Aufreinigung und Sequenzierung der auffälligen Proben

Die in der initialen SSCP auffälligen Proben werden zur Sequenzierung in das externe Labor der Firma Seqlab® geschickt. Ist ein auffälliges Bandenmuster bei mehreren Proben zu finden, wird eine repräsentative Probe zur Sequenzierung versandt. Für die Sequenzierung wird erneut eine PCR mit dem oben genannten Ansatz durchgeführt.

Da überschüssige Primer und freie Nukleotide die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erschweren, ist eine Aufreinigung der Amplifikate notwendig. Hierfür werden 5 µl PCR-Produkt mit 2 µl Exo-SAP-it versetzt und für jeweils 15 min zunächst auf 35° Celsius und anschließend auf 80° Celsius in einem Cycler erhitzt.

Nach Abschluss der Reinigung wird die Reinheit der Proben auf einem 1,5%igem Agarosegel geprüft. Ist das Amplifikat sauber, werden 3 µl des gereinigten Produktes mit 4 µl des entsprechenden Forward-Primers versetzt und an die Firma Seqlab® versandt.

Die Sequenz des Amplifikats wird durch die so genannte Kettenabbruch-Methode bestimmt. Das Prinzip beruht auf einem basenspezifischen Abbruch der DNA-Synthese. Hierfür wird in vier Ansätzen neben den konventionellen dNTP's jeweils eines von vier fluoreszenzmarkierten 2,3'Dideoxynukleotiden hinzugegeben. Durch die fehlende 3'-OH-Gruppe kann die DNA-Polymerase das nächste Nukleotid nicht anhängen und es kommt zum Abbruch der Synthese. Dies kann immer nur dann geschehen, wenn das entsprechende dNTP eingebaut werden müsste. Nach einer Gelelektrophorese der vier Ansätze kann durch ein Laser-Detektionssystem die Basensequenz ausgelesen werden (Sanger et al. 1977).

2.2.6 Untersuchung der Kontrollgruppen

Um mögliche krankheitsspezifische Mutationen gegenüber auch bei Gesunden vorkommenden Polymorphismen abgrenzen zu können, soll für jede Mutation der entsprechende Abschnitt des CHRM2-Gens bei 300 gesunden Probanden untersucht werden. Die hierfür verwendete DNA stammt aus Vollblut von gesunden Spendern der Marburger Blutbank.

Nach einer PCR mit dem entsprechenden Primer wird eine SSCP unter den oben genannten Bedingungen durchgeführt. Um den zuverlässigen Nachweis der Mutation zu gewährleisten, wird die Probe des Mutationsträgers als Positivkontrolle auf jedes Gel aufgetragen.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 337 Patienten mit DCM untersucht. Klinische Daten einer Eingangsuntersuchung zum Zeitpunkt der Aufnahme der DNA der Patienten in die Biomaterialbank des KNHI und einer klinisch-echokardiographischen Verlaufsuntersuchung nach einem Jahr liegen vor. Im Beobachtungszeitraum von einem Jahr verstarben 13 Patienten. Bei drei Patienten wurde eine Herztransplantation durchgeführt.

Anamnestisch erfüllen 82 Patienten die Diagnosekriterien einer familiären DCM nach Mestroni et al. (siehe Kap. 1.2.1). Bei 15 weiteren Patienten ist eine familiäre Komponente nicht ausgeschlossen (siehe Abb. 5).

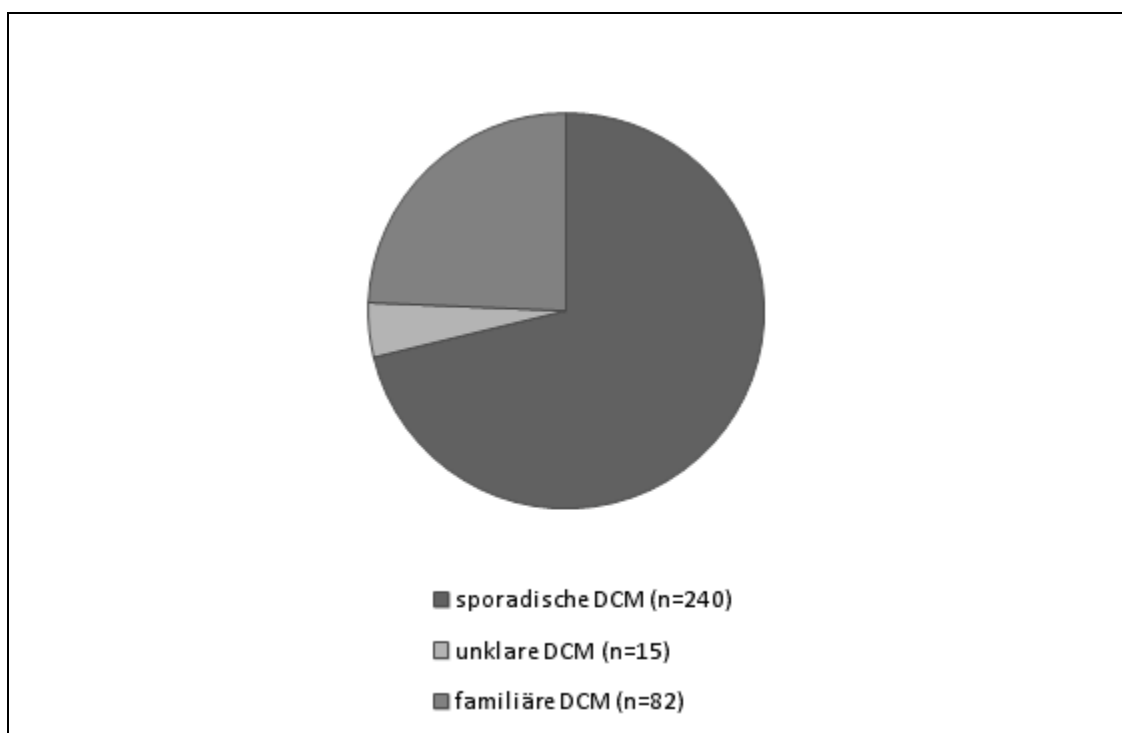
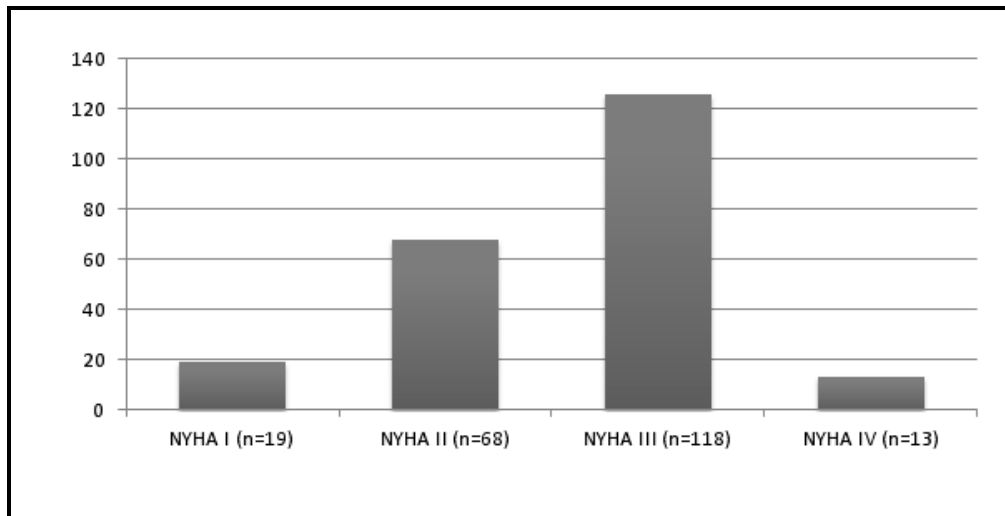


Abb. 5: Prävalenz der familiären DCM im untersuchten Kollektiv.

Die untersuchte Patientengruppe besteht aus 254 Männer und 83 Frauen. Zum Zeitpunkt des Einschlusses der Patienten in das Teilprojekt 9a des KNHI lag das durchschnittliche Alter bei 50 ± 13 Jahren. Der BMI lag mit $27,58 \pm 4,72 \text{ kg/m}^2$ leicht über dem Normalgewicht im präadipösen Bereich. Das klinische NYHA-Stadium wurde zumeist mit zwei oder drei angegeben.

Abb.6: Klinische NYHA-Stadien der untersuchten Patienten



Als echokardiographischer Parameter für die funktionelle Einschränkung des Herzens wurde die EF bei Einschluss und im 1-Jahresverlauf bestimmt. Als morphologischer Parameter diente der LVEDD. Alle Patienten erfüllten die von der European Society of Cardiology geforderten Kriterien für die Diagnose einer DCM (siehe Kapitel 1.2.3.). Im Mittel lag die EF bei Einschluss bei $29,6 \pm 8,36$ % und stieg im 1-Jahresverlauf auf $39,03 \pm 12,42$ % an. Der LVEDD betrug zum Zeitpunkt der Eingangsuntersuchung im Durchschnitt $67,8 \pm 8,38$ mm. Adjustiert nach der Henry-Gleichung entspricht dies $140,34 \pm 16,12$ %. Im Beobachtungszeitraum reduzierte sich der LVEDD auf $64,47 \pm 9,43$ mm.

Eine Subgruppenanalyse der klinischen Daten von Patienten mit familiärer und sporadischer DCM ergab vergleichbare Ergebnisse (siehe Tab. 9). Die Subgruppe der Patienten mit familiärer DCM zeigte im Vergleich zu der Patientengruppe mit sporadischer DCM eine geringere EF sowohl bei Einschluss ($28,59 \pm 9,71$ % zu $29,91 \pm 8,07$ %) als auch im 1-Jahresverlauf ($35,59 \pm 12,39$ % zu $40,22 \pm 12,21$ %). Der BMI lag mit $26,48 \pm 4,08$ kg/m² in der Gruppe der familiären DCM etwas niedriger als bei den Patienten mit sporadischer DCM ($27,87 \pm 4,84$ kg/m²). Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ erreicht keiner dieser Unterschiede statistische Signifikanz.

Tab. 10: Vergleich der klinischen Daten von Patienten mit sporadischer und familiärer DCM.

	Gesamt	Sporadische DCM	Familiäre DCM
Alter (Jahre)	50,03±13	49,85±13	50,58±12,29
Gewicht (kg)	85,54±17,57	86,67±18,34	81,82±14,08
Größe (cm)	175,86±8,91	175,92±8,92	175,67±8,86
BMI (kg/m²)	27,58±4,72	27,87±4,84	26,48±4,08
Herzfrequenz (bpm)	77,17±15,84	76,77±17,21	78,44±10,22
Ejektionsfraktion_{Einschluß} (%)	29,6±8,36	29,91±8,07	28,59±9,17
Ejektionsfraktion_{Follow up} (%)	39,03±12,42	40,22±12,21	35,59±12,39
LVEDD_{Einschluß} (mm)	67,8±8,38	67,7±8,85	68,11±6,62
LVEDD_{adj} (%)	140,14±16,12	139,98±17,81	141,91±16,83
LVEDD_{Follow-up} (mm)	64,47±9,43	64,47±10,08	64,48±7,3
NYHA-Stadium	2,57±0,73	2,6±0,73	2,52±0,73

Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung. BMI = Body Mass Index. NYHA = New York Heart Association. LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser. Als Signifikanzniveau gilt $\alpha=0,05$.

Im Rahmen weiterer, von anderen Teilprojekten des KNHI parallel durchgeführten, molekularbiologischen Untersuchungen wurden bei 41 Patienten Mutationen in acht verschiedenen Krankheitsgenen der DCM nachgewiesen. Am häufigsten zeigten sich Mutationen in der schweren Kette 7 des Myosins (MYH7, n=13) und dem Myosinbindeprotein C3 (MYBPC3, n=13), aber auch im Dystrophin (DMD, n=8), Desmin (DES, n=2), Laminin A/C (LMNA, n=2), Troponin T (TNNT2, n=2), Myopalladin (MYPN, n=2) oder in der Ankyrin-repeat-domain (ANKRD1, n=1) wurden Mutationen nachgewiesen (siehe Abb. 6). Zwei Patienten weisen neben einer Mutation im MYH7 eine weitere Mutation im MYBPC3 bzw. TNNT2 auf. Insgesamt 18 der Mutationsträger zählen zu den Patienten mit einer familiären DCM. Darunter finden sich vier Patienten mit Mutationen im DMD gefolgt von jeweils drei Patienten mit Veränderungen im MYH7 und MYBPC3. Des Weiteren wurden bei den Patienten mit familiärer DCM die Mutationen im LMNA, MYPN und ANKRD1, sowie eine Mutation im TNNT2 nachgewiesen.

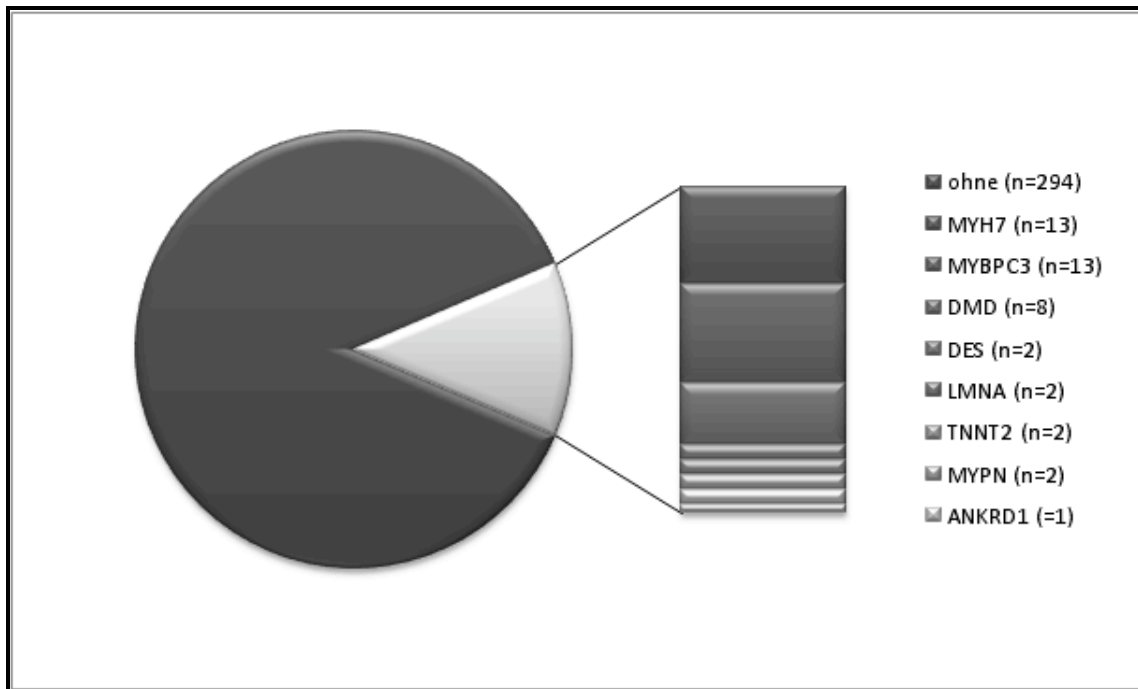


Abb 7: Weitere bekannte Mutationen im untersuchten Kollektiv.

ANKRD1 = ankyrin repeat domain 1. DES = Desmin. DMD = Dystrophin. LMNA = Lamin A/C. MYBPC3 = Myosinbindeprotein C3. MYH7 = β -Mysosin 7. MYPN = Myopalladin. TNNT2 = Troponin T.

3.1 Ergebnisse labormethodischer Voruntersuchungen

Um eine hohe Sensitivität der PCR und SSCP bei der Untersuchung der Patienten zu gewährleisten, wurden vor Beginn der Untersuchung der Patientenproben geeignete Versuchsbedingungen etabliert.

3.1.1 PCR

Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten im PCR-Ansatz sind entscheidend für den Erfolg der PCR. Ein PCR-Ansatz, der bereits bei vorhergehenden Arbeiten erfolgreich verwendet wurde, diente zunächst als Orientierung für die Etablierung der PCR (Ruppert et al. 2010). Eine erste PCR mit diesem Ansatz über 35 Zyklen und einer Annealingtemperatur von 60°C zeigte in der Gelelektrophorese keine Amplifikate. Auch nach einer Reduktion der Annealingtemperatur auf 50°C und dem Zusatz von Dimethylsulfoxid zeigten sich lediglich Primer und überschüssige dNTPs in der Gelelektrophorese. Nach einer Verdopplung der Magnesiumkonzentration auf 1 μ l Mg^{2+} pro 25 μ l PCR-Ansatz wurde schließlich erfolgreich das gewünschte PCR-Produkt nachgewiesen (siehe Abb. 7).

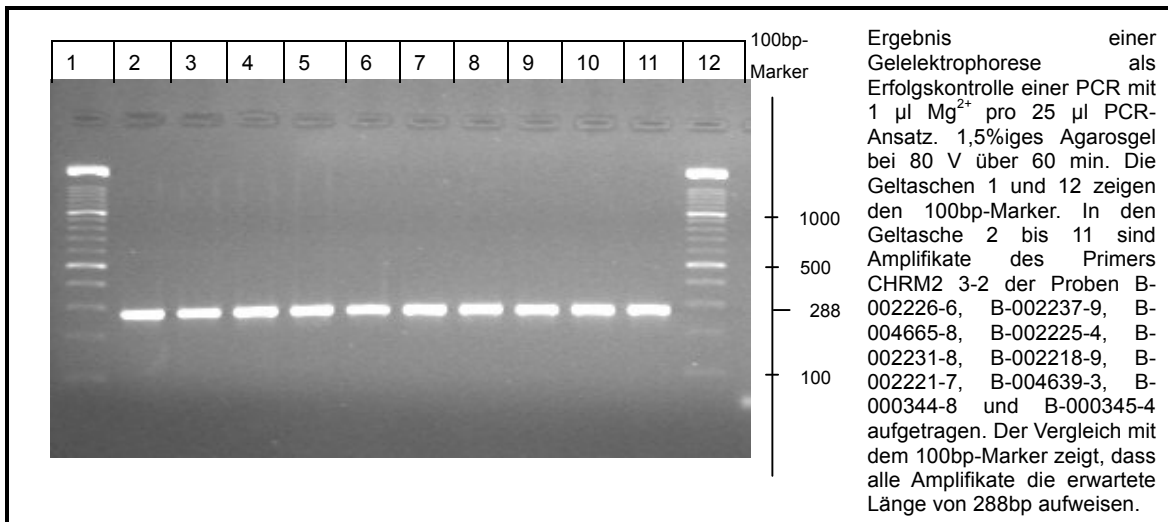


Abb. 8: Erfolgskontrolle der PCR.

3.1.2 SSCP

Ein Anstieg der Temperatur des Polyacrylamidgels während der SSCP kann zum Verschwinden von Unterschieden im Laufverhalten der DNA führen (Glavac und Dean 1993). Die Kontrolle der Temperatur ist bei der SSCP daher ein wichtiger Bestandteil des Versuchsaufbaus. Um trotz der durch den elektrischen Strom entstehenden Hitze eine konstante Temperatur zu gewährleisten, wurde die SSCP in einem Kühlraum bei 4° Celsius durchgeführt.

Zur Ermittlung einer geeigneten Laufzeit der SSCP wurde bei einem 7%igen Polyacrylamidgel bei 300V über fünf Stunden alle 30min je eine Geltasche mit einem PCR-Produkt beladen. Die beste Auftrennung der einzelnen Banden zeigte sich bei vier Stunden, so dass dies als Laufzeit für die Untersuchung der Patienten verwendet wurde (siehe Abb. 8).

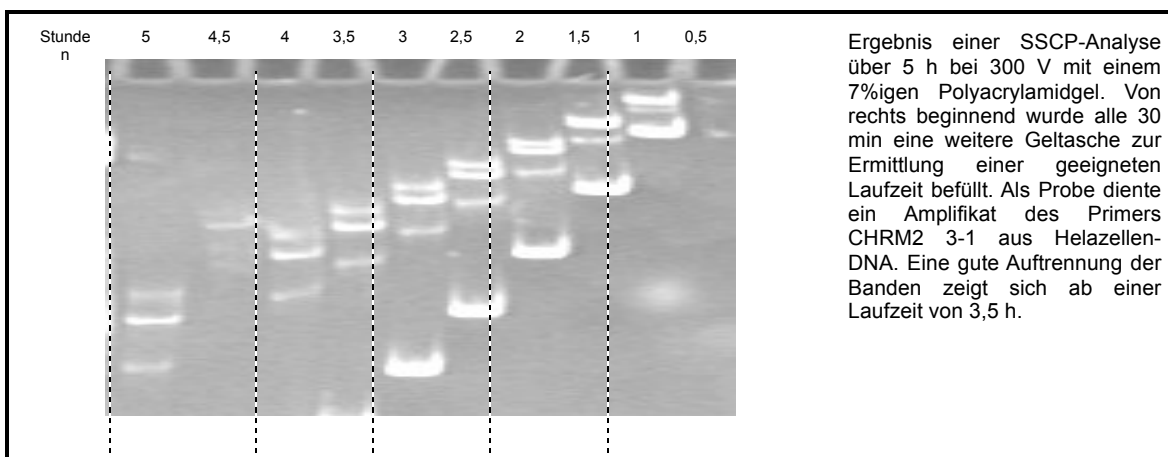


Abb. 9: SSCP Laufzeittest.

Die in der Literatur empfohlene Polyacrylamidkonzentration für Gele der SSCP liegt bei 5-12 % (Fujita und Silver 1994). Im Rahmen der Etablierung der Versuchsbedingungen wurden Gele mit 5 %, 7 % und 10 % Polyacrylamid getestet. Die besten Ergebnisse zeigten sich bei 7%igen Polyacrylamidgelen.

Als Laufpuffer diente ein TBE-Puffer mit einem pH-Wert von 8,4. Ein in der Literatur beschriebener Zusatz von Glycin beim Gießen der Gele zur Verbesserung der Sensitivität verschlechterte die Qualität der Banden, so dass darauf verzichtet wurde (Kukita et al. 1994).

Die im weiteren Verlauf bei Patienten nachgewiesene Mutation G885A (siehe Kap. 3.2. Seite 33) im Bereich des Primers CHRM2 3-4 konnte bei der Untersuchung der Kontrollgruppe unter den ursprünglichen Versuchsbedingungen nicht zuverlässig nachgewiesen werden. Eine Anpassung der Versuchsbedingungen war daher notwendig.

Zunächst wurde die Polyacrylamidkonzentration bei 4° Celsius auf 10 % erhöht und auf 6 % erniedrigt. Beide Alternativen zeigten keinen verbesserten Nachweis der Mutation. Eine SSCP bei Raumtemperatur oder eine Veränderung der Laufzeit brachten ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg. Erst mit einer Reduktion der angelegten Spannung auf 100 V und einer Verlängerung der Laufzeit auf 18 Stunden konnte die Mutation G885A auch bei der Untersuchung der Kontrollgruppe als Positivkontrolle eindeutig und stabil detektiert werden.

3.2 Untersuchung der Patienten

Nach Etablierung der PCR und SSCP wurde bei 336 der 337 Patienten erfolgreich eine PCR mit allen acht Primerpaaren durchgeführt. Bei einer Probe konnte mit keinem der acht Primer auch nach mehrmaligem Versuch ein PCR-Produkt gewonnen werden.

Nach einer Elektrophorese von vier Stunden bei 300V wurde die DNA in den Polyacrylamidgelen in einem Ethidiumbromidbad gefärbt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und ausgewertet. Die Abbildungen 9 bis 16 zeigen exemplarisch SSCP-Analysen mit den in Tabelle 7 aufgeführten Primern CHRM2 3-1 bis CHRM2 3-8 ohne den Nachweis einer Mutation.

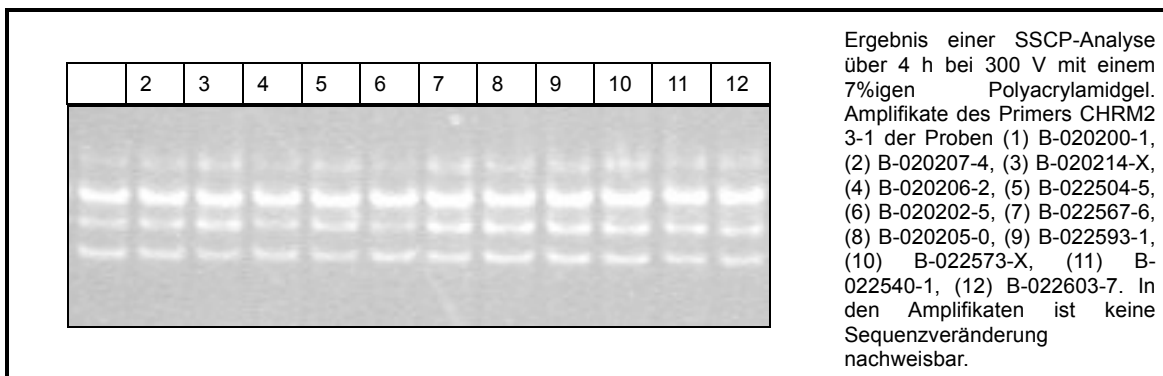


Abb. 10: Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-1 ohne Mutation.

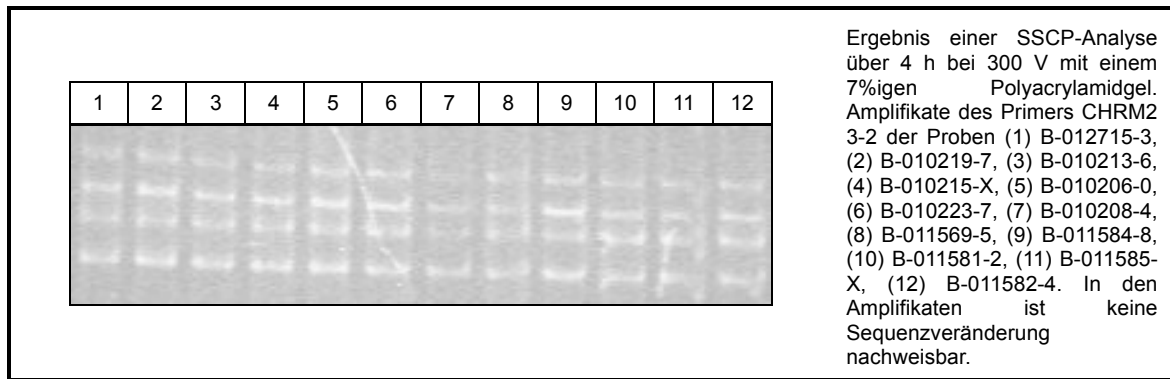


Abb. 11: Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-2 ohne Mutation.

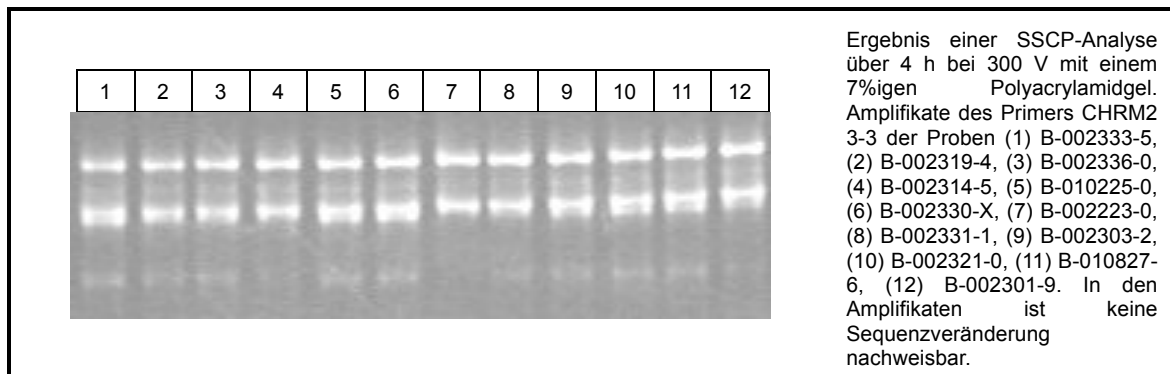


Abb. 12: Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-3 ohne Mutation.

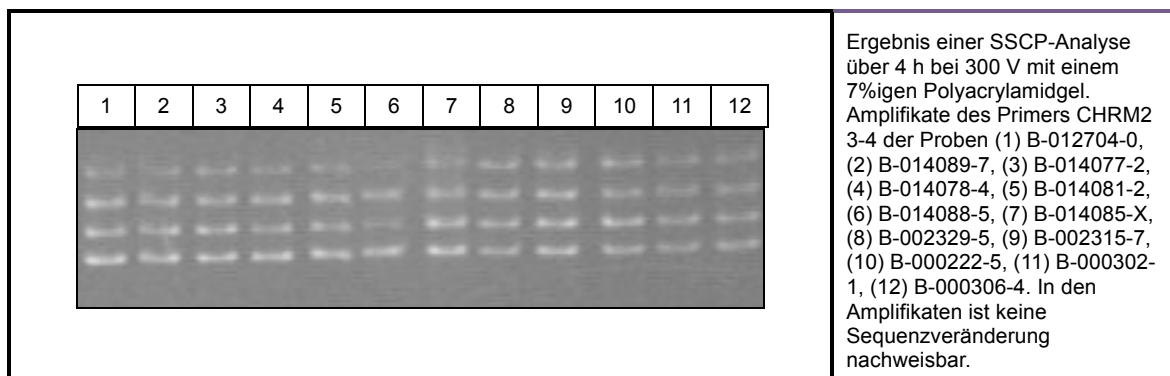


Abb. 13: Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-4 ohne Mutation.

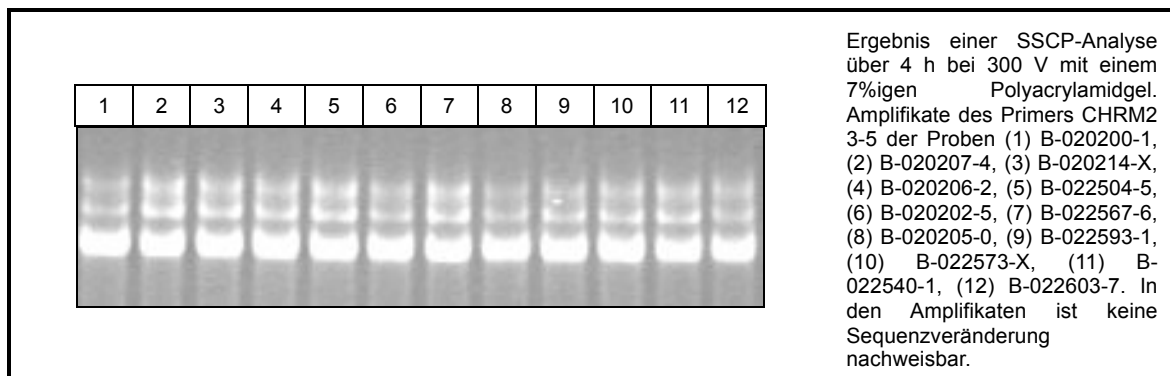


Abb. 14: Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-5 ohne Mutation.

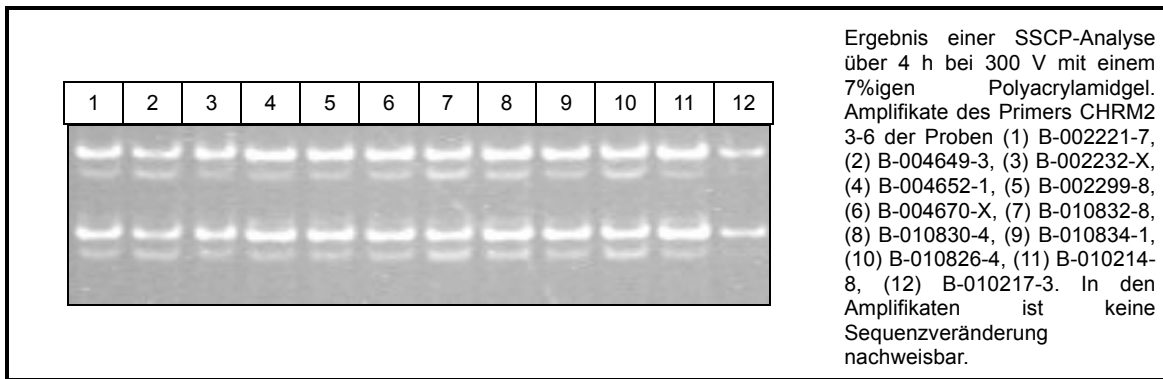


Abb. 15: Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-6 ohne Mutation.

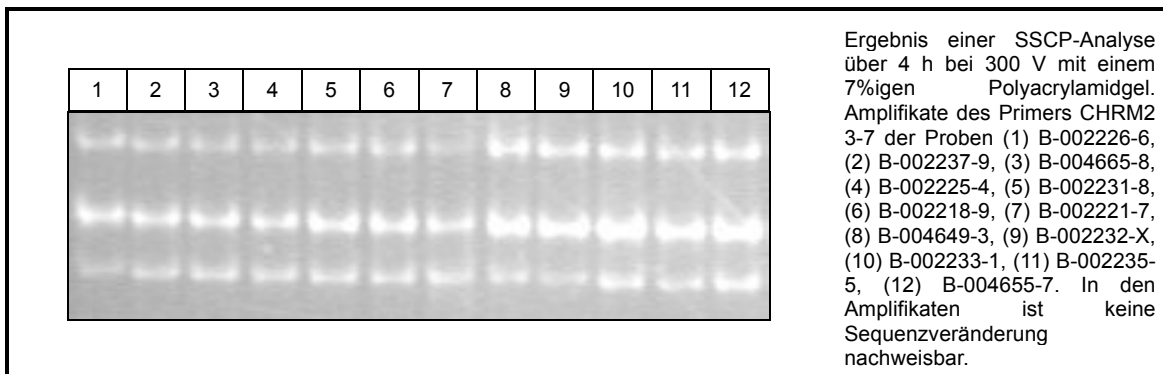


Abb. 16: Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-7 ohne Mutation.

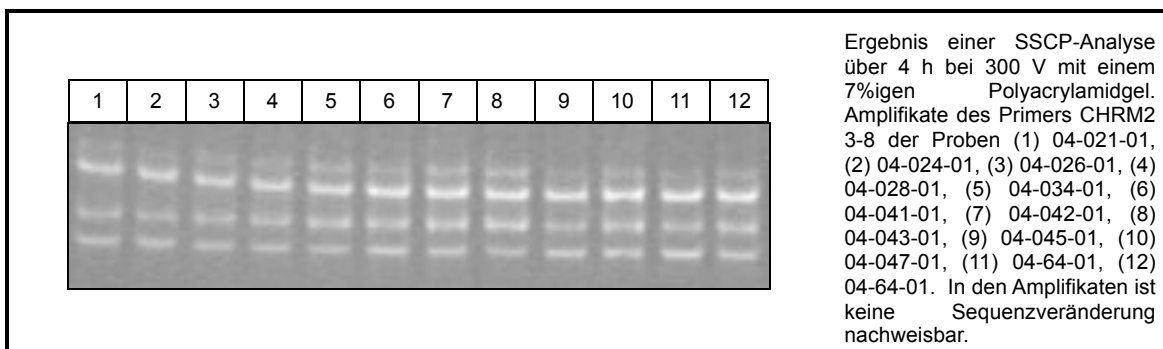


Abb. 17: Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-8 ohne Mutation.

Zeigten Proben ein abweichendes Laufverhalten oder ein auffälliges Bandenmuster wurde mit der entsprechenden DNA erneut eine PCR durchgeführt, das Produkt gereinigt und zur Sequenzierung verschickt. Insgesamt wurden von 30 Patienten 33 Amplifikate sequenziert. Davon zeigten 29 der im SSCP-Gel initial auffälligen Proben einen Wildtyp. Unter den vier übrigen Proben fanden sich drei Veränderungen im CHRM2-Gen.

Mit dem Primerpaar CHRM2 3-3 wurde bei einem Patienten der stille, bisher nicht beschriebene Polymorphismus C650T (Phenylalanin152Phenylalanin) nachgewiesen (siehe Abb. 17). Der Patient ist männlich und hat einen BMI von 31 kg/m^2 . Bei Aufnahme in die Patientengruppe des KNHI war er 47 Jahre alt. Seine EF lag zu diesem Zeitpunkt bei 40 % mit einem LVEDD von 66mm. Adjustiert nach der Henry-Gleichung entspricht dies 136,45 %. Bis zur Verlaufskontrolle nach einem Jahr stieg die EF auf 54 % und der LVEDD reduzierte sich auf 58 mm. In der Familienanamnese gibt es keinen Hinweis auf das Vorliegen einer familiären DCM.

Da es zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz kommt, ist davon auszugehen, dass es sich um einen Polymorphismus ohne weitere Bedeutung hinsichtlich der Entstehung der Erkrankung handelt. Es wurde daher auf die Untersuchung einer Kontrollgruppe bezüglich dieses Polymorphismus verzichtet.

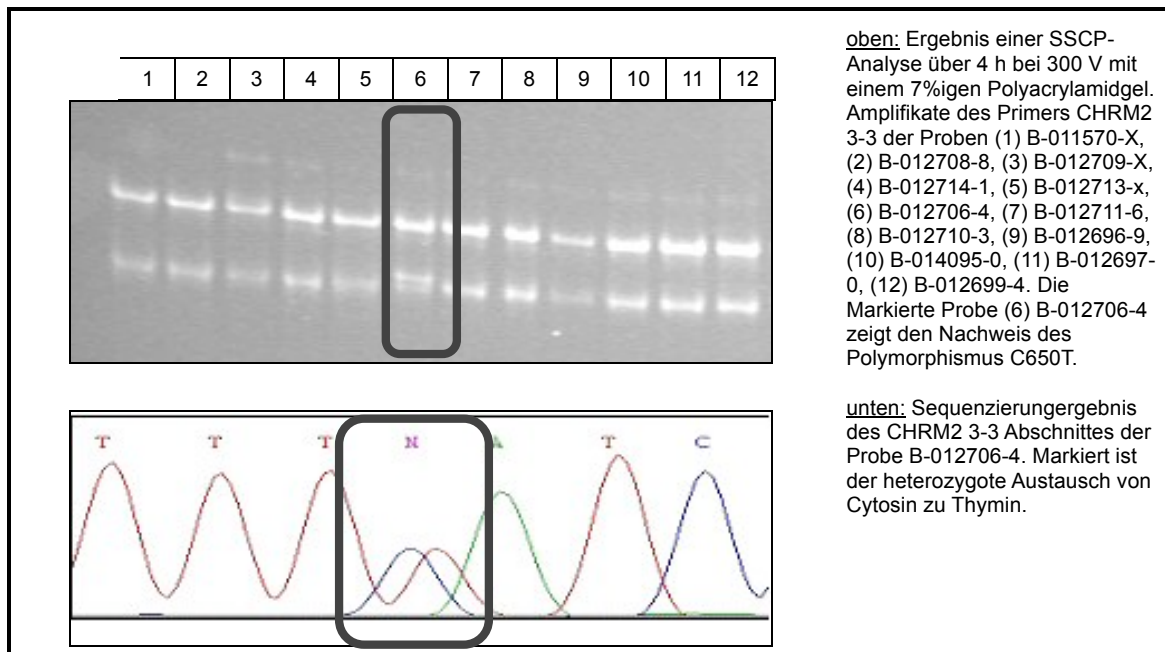


Abb. 18: Nachweis des Polymorphismus C650T in SSCP und Sequenzierung.

Im Gegensatz dazu wurde mit den Primern CHRM2 3-4 und CHRM2 3-6 bzw. 3-7 jeweils eine Missense-Mutation gefunden, die einen Aminosäureaustausch im Rezeptorprotein zur Folge hat. Es handelte sich um die Mutation G885A im Amplifikat des Primers CHRM2 3-4 und die Mutation G1268C im überlappenden Bereich der Primer CHRM2 3-6 und 3.7.

Die Mutation G885A führt zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin an Position 231 im Rezeptorprotein (siehe Abb. 18). Der Patient, bei dem diese Mutation nachgewiesen werden konnte, ist weiblich und mit einem BMI von 19 kg/m^2 normalgewichtig. Bei Einschluss war die Patientin 55 Jahre alt. Die echokardiographische Untersuchung zeigte eine EF von 35 % bei einem LVEDD von 55 mm oder 122,21 % nach dem Henry-Index. Im EKG fiel ein Linksschenkelblock auf.

In den 14 Monaten bis zur Verlaufskontrolle reduzierte sich die EF auf 30%. Angaben zum LVEDD bei der Verlaufskontrolle liegen nicht vor. Bisher gibt es keinen Anhalt für das Vorliegen einer familiären DCM.

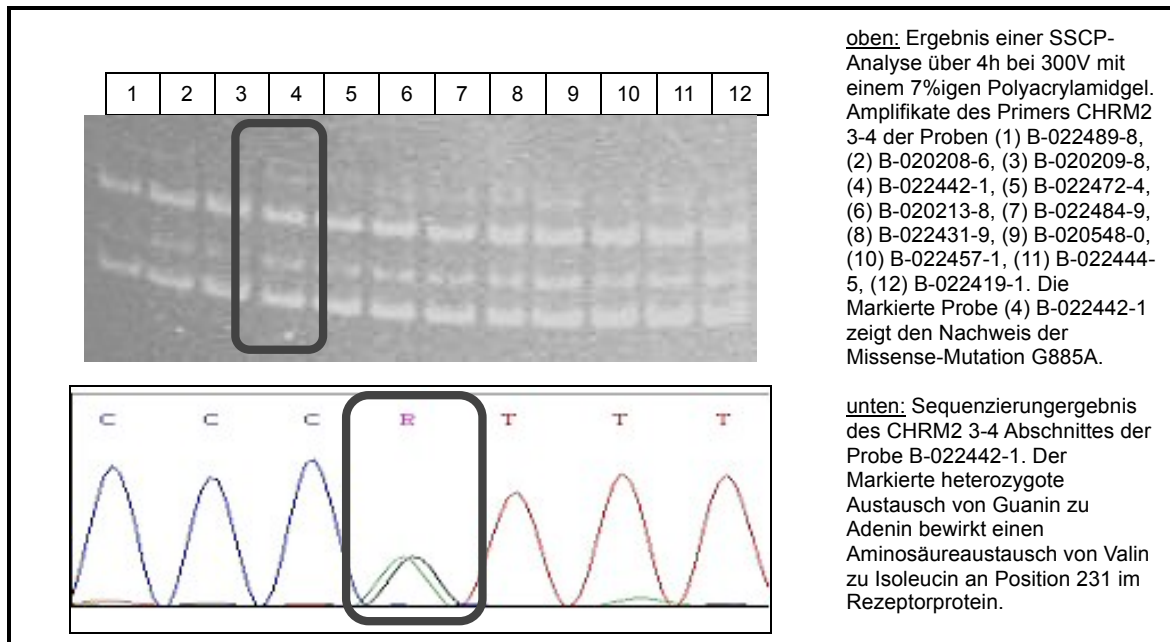


Abb. 19: Nachweis der Missense-Mutation G885A in SSCP und Sequenzierung.

Durch die Mutation G1268C wird Glutamin an Position 358 im Rezeptorprotein durch Histidin ersetzt. Da sie im überlappenden Bereich der Primer CHRM2 3-6 und 3-7 liegt, wurde sie in den Amplifikaten beider Primer nachgewiesen (siehe Abb. 19).

Der Mutationsträger ist männlich und war bei Einschluss in die Verlaufsbeobachtung 49 Jahre alt. Sein BMI betrug 33 kg/m^2 . Die EF lag initial bei 39 % bei einem LVEDD von 62 mm oder 123,85 % nach dem Henry-Index. Bis zur Verlaufskontrolle nach elf Monaten stieg die EF auf 53 %. Der LVEDD blieb mit 60 mm in etwa konstant.

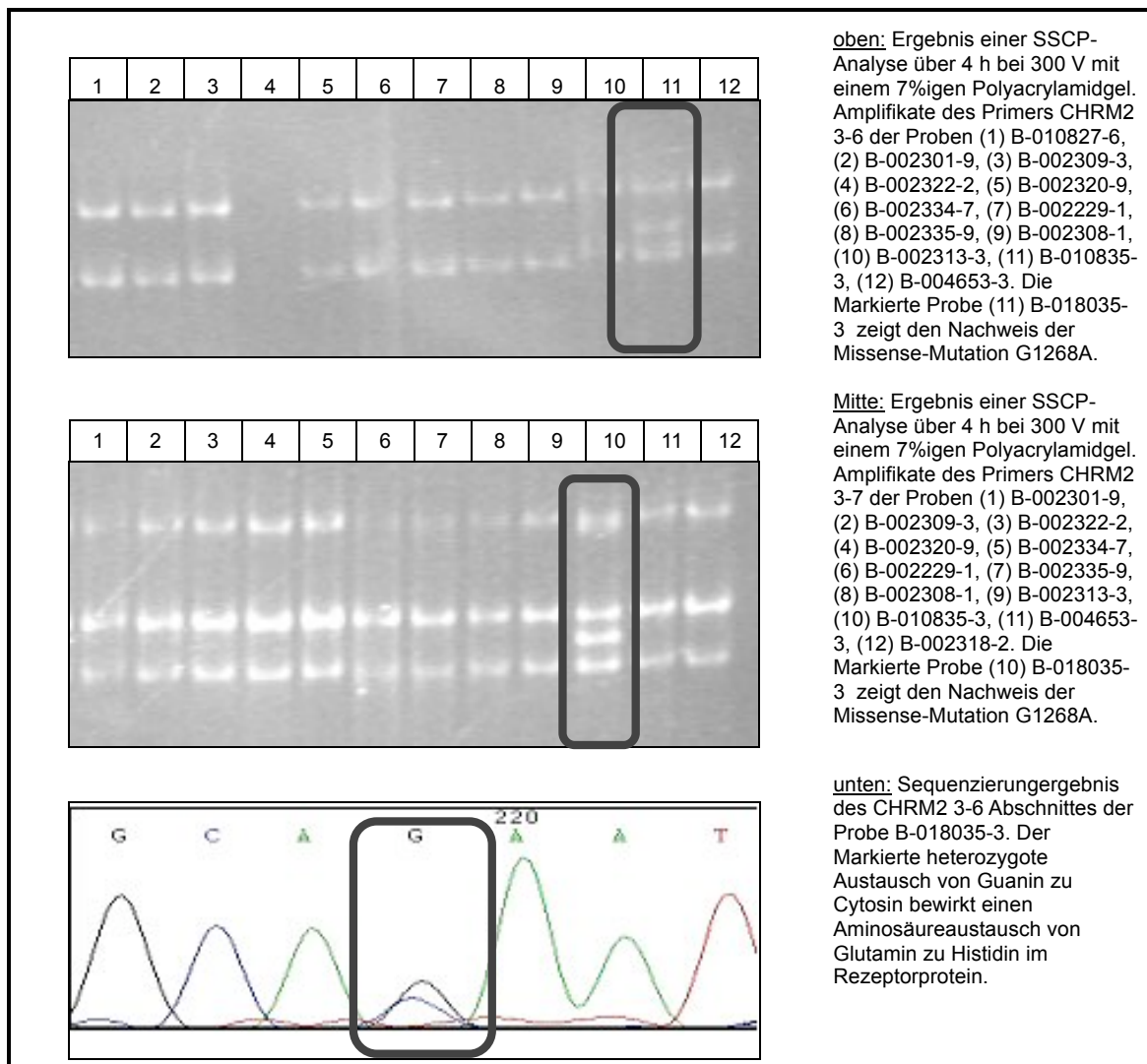


Abb. 20: Nachweis der Mutation G1269C in SSCP und Sequenzierung.

Mit einem ebenfalls an DCM erkrankten Sohn erfüllt dieser Patient die Diagnosekriterien der familiären DCM nach Mestroni et al. In der Sequenzierung des entsprechenden Abschnittes im CHRM2-Gen aus Vollblut-DNA-Extrakt des Sohnes konnte die Mutation G1268C ebenfalls nachgewiesen werden.

Um Polymorphismen, die unter Umständen auch in der gesunden Bevölkerung gefunden werden können, gegenüber möglichen krankheitsverursachenden Mutationen abzugrenzen, wurde DNA-Extrakt aus Vollblut einer Kontrollgruppe von 300 gesunden Spendern der Marburger Blutbank bezüglich dem Auftreten der beiden gefundenen Mutationen untersucht.

Durch eine PCR mit den Primern CHRM2 3-4 bzw. CHRM2 3-7 wurde der entsprechende Abschnitt des CHRM2-Gens aus dem DNA-Extrakt der Probanden der Kontrollgruppe amplifiziert und anschließend mit Hilfe der SSCP untersucht. Um eine ausreichende Sensitivität der SSCP zu gewährleisten, diente das Amplifikat des jeweiligen Mutationsträgers als Positivkontrolle bei allen Gelelektrophoresen der Kontrollgruppe. Die Mutation G1268C im Bereich des Primers CHRM2 3-7 konnte bei keinem der 300 gesunden Probanden nachgewiesen werden. Die Mutation im Amplifikat des Indexpatienten war stets nachweisbar (siehe Abb. 20).

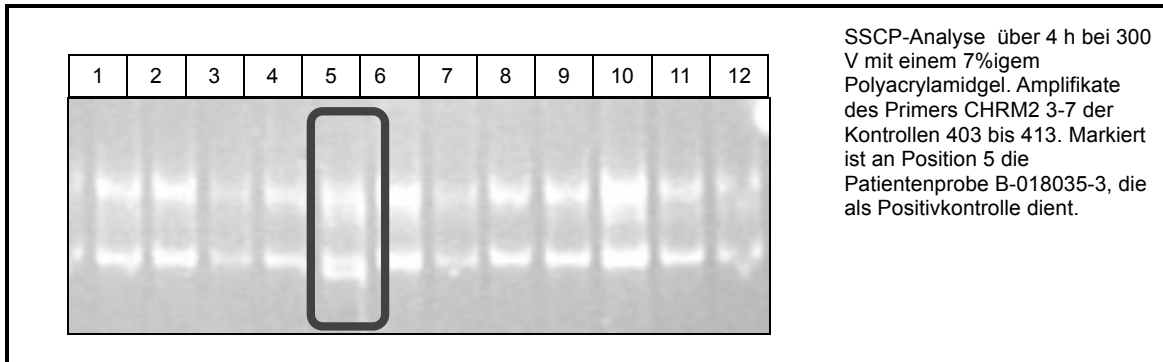


Abb. 21: SSCP der Kontrollgruppe mit dem Träger der Mutation G1268C als Positivkontrolle.

Nach Optimierung der Versuchsbedingungen (siehe Kap. 3.1.2) konnte die Mutation G885A im Extrakt der Kontrollgruppe zuverlässig untersucht werden. Auch hier zeigten sich bei stabilem Nachweis der Mutation in der Positivkontrolle keine Veränderungen im Laufverhalten der übrigen Amplifikate (siehe Abb. 21).

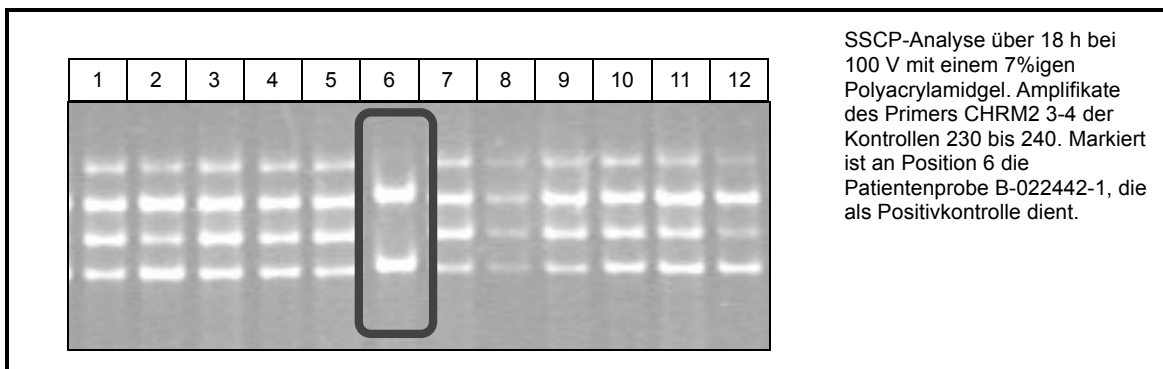


Abb. 22: SSCP der Kontrollgruppe mit dem Träger der Mutation G885A als Positivkontrolle.

Zusammenfassend wurden 336 Patienten mit DCM erfolgreich auf Mutationen im CHRM2-Gen untersucht. Es konnten ein Polymorphismus und zwei Missense-Mutationen identifiziert werden. Keine der gefundenen Veränderungen ist bisher in der Literatur beschrieben. Beide Missense-Mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch im Rezeptorprotein und sind in einer Kontrollgruppe aus gesunden Probanden nicht nachweisbar. Neben den beiden Mutationsträgern in der Patientengruppe wurde ein ebenfalls an DCM erkrankter Verwandter des Indexpatienten mit der Mutation G1268C als weiterer Träger identifiziert.

Im Gegensatz zur Mehrzahl der untersuchten Patienten verschlechterte sich bei der Trägerin der Mutation G885A im 1-Jahresverlauf die EF. Bemerkenswerterweise liegen bei dieser Patientin mit einem Alter über 54 Jahre und einem Linksschenkelblock zwei Prädiktoren für einen progressiven Verlauf der Erkrankung vor. Weitere Auffälligkeiten hinsichtlich der klinischen Daten sind bei keinem der Mutationsträger zu finden (siehe Tab. 10).

Tab. 11: Klinische Daten der Mutationsträger.

	Mittelwert	C650T	G885A	G1268C
Alter (Jahre)	50,03±13	47	55	49
Gewicht (kg)	85,54±17,57	89	58	102
Größe (cm)	175,86±8,91	168	172	176
BMI (kg/m ²)	27,58±4,72	31,53	19,61	32,93
Herzfrequenz (bpm)	77,17±15,84	53	62	70
EjektionsfraktionEinschluß (%)	29,6±8,36	40	35	39
EjektionsfraktionFollow up (%)	39,03±12,42	54	30	53
LVEDDEinschluß (mm)	67,8±8,38	66	63	55
LVEDDadj (%)	140,14±16,12	136,45	122,22	123,86
LVEDDFollow-up (mm)	64,47±9,43	58	k.A.	60
NYHA Stadium	2,57±0,73	2	2	2

Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung. BMI = Body Mass Index. LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser. NYHA = New York Heart Association. k.A = keine Angabe. Als Signifikanzniveau gilt $\alpha=0,05$.

Bei keiner der 300 untersuchten Blutproben der Kontrollpersonen konnten die bei den Patienten mit DCM identifizierten Missense-Mutationen nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der molekularbiologischen Methoden

4.1.1 Touch-Down-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist die Methode der Wahl zur Amplifikation von DNA. Bereits 1983 wurde sie von Kary Mullis entwickelt und gehört heute zu den Routineverfahren der Molekularbiologie. Mit Hilfe der PCR wird in dieser Arbeit die kodierende Region des CHRM2-Gens amplifiziert.

Vorraussetzung für die Amplifikation der kodierenden Region des CHRM2-Gens sind Primer, die spezifisch an die Zielsequenz zu Beginn und Ende des gewünschten DNA-Abschnittes binden. Computerprogramme, wie zum Beispiel „Gene Sorter“ oder „Primer 3“, helfen bei der Auswahl geeigneter Primer. Für die Amplifikation der gesamten kodierenden Region des CHMR2-Gens wurden insgesamt acht Primerpaare verwendet. Eine Überlappung zwischen den einzelnen Fragmenten soll die Amplifikation des vollständigen Gens gewährleisten (Mülhardt 2009).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Etablierung einer PCR ist die Abstimmung der Versuchsbedingungen mit dem Temperaturverhalten der Primer. Hierbei ist insbesondere das Verhältnis der Annealingtemperatur zur Schmelztemperatur der Primer von Bedeutung. Je näher die Annealingtemperatur im Bereich der Schmelztemperatur der Primer liegt, umso schwächer, aber auch umso spezifischer ist die Hybridisierung zwischen DNA und Primer. Bei niedrigen Annealingtemperaturen ist die Primerbindung stärker, dafür aber weniger spezifisch und die Qualität des Amplifikats kann sich verschlechtern.

Ist die Einstellung einer optimalen Annealingtemperatur schwierig, kann eine Touch-down-PCR mit dezelerierenden Annealingtemperaturen helfen, die Qualität des Amplifikats zu erhöhen. Zu Beginn einer Touch-down-PCR liegen die Annealingtemperaturen zunächst oberhalb der Schmelztemperatur der Primer und werden durch schrittweise Reduktion der optimalen Annealingtemperatur angenähert. Die Amplifikation der DNA beginnt somit im Bereich der idealen Annealingtemperatur. Die hierdurch erreichte spezifische Primerbindung zu Beginn der Amplifikation erhöht die Reinheit des PCR-Produktes. Bei späteren Zyklen mit niedrigeren Annealingtemperaturen ist die Hybridisierung der Primer zwar weniger spezifisch, allerdings ist das gewünschte Amplifikat bereits im Überschuss vorhanden, so dass es zu keiner nennenswerten Verunreinigung des Amplifikats kommt. Insgesamt wird durch die Touch-down-PCR im Vergleich zu einer herkömmlichen PCR etwas weniger Amplifikat gewonnen, dafür aber die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten reduziert (Korbie und Mattick 2008).

Eine Agarosegelelektrophorese des Amplifikats mit einem parallel aufgetragenen Längenstandard zeigt, ob das gewonnene Amplifikat im erwarteten Größenbereich liegt. Den Beweis für die Amplifikation des korrekten DNA-Abschnittes kann jedoch nur die Bestimmung der Basensequenz erbringen. Da im Verlauf dieser Arbeit Amplifikate aller acht Primerpaare sequenziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die für den m2AChR kodierende Region des CHRM2-Gens vollständig amplifiziert wurde.

4.1.2 Single-stranded-conformation-polymorphism Gelelektrophorese

Zu den molekularbiologischen Methoden, die sich für die Suche nach unbekannten Mutationen in einem Gen eignen, zählen unter anderem die Heteroduplexanalyse, die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE), die Single-stranded-conformation-polymorphism Gelelektrophorese (SSCP) und die Sequenzierung.

Die Auswahl der Methode richtet sich nach der Größe des Gens, Verfügbarkeit der Ressourcen, dem Grad der benötigten Sensitivität bzw. Spezifität sowie Kosten/Nutzen-Abwägungen.

Bei der Heteroduplexanalyse wird DNA mit einer fraglichen Mutation mit Wildtyp-DNA gemischt. Durch Erwärmen entsteht zunächst ssDNA. Während dem nachfolgenden langsamen Abkühlen kommt es zum erneuten Annealing der Einzelstränge. Befinden sich im untersuchten DNA-Abschnitt Mutationen, bilden sich neben den ursprünglichen Homoduplexen auch Heteroduplexe mit je einem Allel des Wildtyps und der Mutation. Zeigen die Heteroduplexe bei der Gelelektrophorese ein verändertes Laufverhalten, können so Mutationen identifiziert werden. Während Veränderungen größer als drei Basenpaare bei der Heteroduplexanalyse zuverlässig detektiert werden, ist ihre Sensitivität bei Punktmutationen eher gering (Konstantinos et al. 2007).

Sind bei Patienten mit DCM Mutationen in Krankheitsgenen nachweisbar, handelt es sich meist um Missense-Mutationen und kleine Deletionen bzw. Insertionen (Hershberger et al. 2010). Die Heteroduplexanalyse ist daher für diese Art der Untersuchung nicht die geeignete Methode.

Das unter dem Aspekt der Sensitivität und Spezifität am besten geeignete Verfahren ist die direkte Sequenzierung des zu untersuchenden Gens. Sie ist die schnellste und einfachste Methode zur Identifizierung von unbekannten Mutationen. Ein Nachteil der Sequenzierung sind die hohen Kosten für die Anschaffung des benötigten Materials. Daher ist die Sequenzierung als primäre Untersuchungsmethode bei größeren Untersuchungen nicht die Methode der ersten Wahl (Petrou et al. 2002).

Insbesondere wenn die Prävalenz von Mutationen im untersuchten Gen nicht sicher vorher zu sagen ist, sind DGGE oder SSCP geeignete molekularbiologische Methoden. Beide Verfahren sind für die Untersuchung von großen Patientengruppen geeignet.

Die DGGE ist in der Durchführung anspruchsvoller und stellt besondere Anforderungen an das Primerdesign. Die benötigten Primer sind verhältnismäßig lang und erfordern einen 30-40bp umfassenden Guanosin-Cytosin-Anker am 5'-Ende der Primer. Dies hat zur Folge, dass die DGGE für die Untersuchung von Guanosin- und Cytosin-reichen Regionen nicht geeignet ist (Konstatinos et al. 2007).

Da die Einstellung des denaturierenden Gradienten im Gel der DGGE Schwierigkeiten bereiten kann und die SSCP bei vergleichbarer Sensitivität die etwas günstigere Methode darstellt, wurde in dieser Arbeit die SSCP verwendet (Petrou et al. 2002).

Leider existiert zurzeit kein theoretisches Modell, mit dem es möglich ist, die dreidimensionale Struktur der ssDNA bei einer bekannten Nukleotidsequenz unter vorgegebenen Bedingungen vorherzusagen. Dies führt zu einem der Nachteile der SSCP, nämlich Schwierigkeiten bei der Etablierung maximal sensibler Versuchsbedingungen.

Eine mögliche Methode, die Sensitivität der SSCP zu erhöhen, ist die Durchführung von mehreren Elektrophoresedurchgängen, wobei Veränderungen der Temperatur, der Polyacrylamidkonzentration oder anderer Parameter vorgenommen werden. Auch die Kombination mit anderen molekularbiologischen Methoden, wie zum Beispiel der Heteroduplexanalyse, kann die Sensitivität erhöhen (Glavac und Dean 1993).

Allgemein sind Veränderungen von Basen in der Mitte des Amplifikats besser mit der SSCP nachzuweisen als Mutationen am Anfang oder Ende. Die Art der Mutation scheint dabei für die Sensitivität keine Bedeutung zu haben.

In einem langen Fragment haben Veränderungen einzelner Basen einen geringeren Einfluss auf die Sekundärstruktur des Moleküls als in einem kurzen Fragment, daher ist die Sensitivität der SSCP abhängig von der Länge der untersuchten Fragmente. Die besten Ergebnisse werden dabei für Fragmente mit etwa 150 bis 300bp erzielt (Sheffield et al. 1993).

Durch die Verwendung von acht Primerpaaren für die 1401kbp umfassende kodierende Region des CHRM2-Gens wurden acht verschiedene Fragmente mit einer für die SSCP optimalen Länge von etwa 300bp amplifiziert. Eine Polyacrylamidkonzentration von 7 % und eine Laufzeit von vier Stunden bei 300 V zeigten bei der Etablierung der Versuchsbedingungen die besten Ergebnisse, so dass sie für die weiteren Elektrophoresen verwendet wurden (siehe Kapitel 3.1.2).

Hat eine Mutation keine oder nur geringe Auswirkung auf die Sekundärstruktur der ssDNA kann der Nachweis auch trotz optimaler Versuchsbedingungen schwierig sein. Anhand der Mutation G885A konnte allerdings gezeigt werden, dass bei bekannten Mutationen durch Veränderungen der Versuchsparameter meist ein zuverlässiger Nachweis erreicht werden kann (siehe Kapitel 3.1.2).

Aufgrund der fehlenden Positivkontrollen ist eine exakte Aussage über die Sensitivität der SSCP in dieser Arbeit nicht möglich. In der Literatur ist jedoch für Amplifikate mit etwa 300bp bei einmaliger SSCP eine Sensitivität von 85-95 % beschrieben (Hayashi und Yandell 1993).

Auf der einen Seite zeigt die notwendige Anpassung der Versuchsbedingungen zum zuverlässigen Nachweis der Mutation G885A die Grenzen auf, mit der die SSCP betrachtet werden muss. Auf der anderen Seite spricht der zuverlässige Nachweis der Mutation G1289C sowohl mit den Primern CHRM2 3-6 und CHRM2 3-7 als auch bei der Untersuchung der 300 Kontrollen, für eine hohe Sensitivität der hier verwendeten Versuchsbedingungen.

Eine Reproduktion der Ergebnisse bzw. der Vergleich der untersuchten Proben untereinander war durch eine standardisierte Vorbereitung und Durchführung der Versuche jederzeit möglich. Für jede gefundene Mutation wurde jeweils eine zweite unabhängige DNA-Probe als Bestätigung untersucht.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die DCM ist sowohl klinisch als auch pathogenetisch eine heterogene Erkrankung. Neben inflammatorischen und immunologischen Faktoren spielen vor allem genetische Veränderungen ätiologisch eine wichtige Rolle. Bis heute wird die DCM in Zusammenhang mit Mutationen in über 30 Genen gebracht. Bei mindestens 30 % aller an DCM erkrankten Patienten wird eine genetische Beteiligung angenommen.

Mit Hilfe einer molekularbiologischen Routineuntersuchung für Patienten mit DCM und deren Angehörige wäre es möglich, Risikopatienten zu identifizieren und sie im Sinne einer Sekundärprävention kardiologisch zu betreuen. Durch einen frühzeitigen Beginn der Therapie bei Zeichen der Manifestation einer DCM könnten so Morbidität und Mortalität reduziert werden (Hershberger et al. 2009). Das Ziel der aktuellen Forschung ist es daher, durch die Identifizierung weiterer Krankheitsgene das Verständnis der genetischen Pathogenese der DCM zu komplettieren.

Auch wenn es sich bei den bisher identifizierten Krankheitsgenen vor allem um Mutationen in Proteinen des Sarkomers oder des Zytoskeletts handelt, ist nach der Identifikation der Gene des Natriumkanals 5A (SCN5A) und der ATP-binding-cassette C9 des K⁺-Einwärtsgleichrichterkanals (ABCC9) als weitere Krankheitsgene der DCM die Untersuchung von Rezeptorproteinen und deren Regulatoren ebenfalls vielversprechend (Bienengräber et al. 2004, McNair et al. 2004).

Autoantikörper gegen den m2AChR sind im Serum bei über 30 % aller Patienten mit DCM nachweisbar. Im Vergleich mit gesunden Probanden treten sie lediglich bei Patienten mit DCM oder Myokarditis vermehrt auf (Caforio et al. 2002 und 2007).

Die Autoantikörper wirken dabei als Agonisten am Rezeptor. Sie führen zu einer Veränderung der Funktion des Sinusknotens und sind vermehrt bei Patienten mit Arrhythmien wie zum Beispiel Vorhofflimmern zu finden. In Tierversuchen konnte ein negativ inotroper Effekt der m2AChR-Antikörper durch eine Reduktion der L-Typ Calciumkanäle beobachtet werden (Fu et al. 1996 und Wallukat et al. 1999).

Ob m2AChR-Antikörper ursächlich an der Entstehung der DCM beteiligt sind oder sie aufgrund struktureller Veränderungen des Myokards durch die Erkrankung entstehen, ist nicht abschließend geklärt. Unabhängig von ihrem Entstehungsmechanismus liegt aber die Vermutung nahe, dass Veränderungen im Rezeptorprotein selbst auch für eine DCM prädisponieren können.

Bereits die Publikationen von Hautala et al. 2006 und 2009 demonstrieren, dass molekularbiologische Veränderungen des CHRM2-Gens Auswirkungen auf die autonome Regulation des Herzens haben. Es konnte gezeigt werden, dass die Erholung der Herzfrequenz nach Belastung bei Probanden mit SNPs im CHRM2-Gen signifikant reduziert ist. Die untersuchten SNPs führen zu transkriptionellen Veränderungen und könnten die weitere Prozessierung der RNA beeinflussen. Da sich die SNPs im Bereich eines Introns bzw. einer nicht translatierten Region am 3'-Ende des Gens befinden, kommt es zu keiner Translation der Polymorphismen und somit nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Rezeptorproteins.

Den ersten Hinweis auf eine Rolle des CHRM2-Gens als Krankheitsgen bei Patienten mit DCM erbrachten Zhang et al. 2008. Die von ihnen bei Patienten mit familiärer DCM gefundene Mutation im CHRM2-Gen befindet sich in der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors, einem Bereich des Rezeptorproteins, der als Epitop der m2AChR-Antikörper gilt. Es ist denkbar, dass molekularbiologische Veränderungen der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors ursächlich für die Entstehung von m2AChR-Antikörpern sein können.

Weitere Arbeiten zur Rolle des CHRM2-Gen in der Pathogenese der DCM existieren nicht. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden Mutationen im m2AChR zu identifizieren und Hinweise für ihren Einfluss auf die Erkrankung zu erhalten. Tatsächlich konnten zwei Missense-Mutationen und ein Polymorphismus im CHRM2-Gen identifiziert werden.

4.2.1 Vergleich des CHRM2-Gens mit anderen Krankheitsgenen der DCM

Im Unterschied zu anderen Kardiomyopathien handelt es sich bei der durch genetische Veränderungen hervorgerufenen DCM um eine sehr heterogene Erkrankung. Bei einer Untersuchung von Hershberger et al. von insgesamt 14 Genen bei 312 Patienten mit idiopathischer und familiärer DCM wurden in 28 % der Fälle genetische Veränderungen gefunden. Im Vergleich dazu werden bei der HCM Mutationen in nur zwei Gene, dem MYH7 und dem MYBPC3, als Krankheitsursache bei 50-60 % aller Patienten mit HCM oder bei bis zu 90 % aller Patienten mit genetischer Ursache der HCM verantwortlich gemacht (Hershberger et al. 2010). In der hier untersuchten Patientengruppe konnte in vorhergehenden Untersuchungen bei 13 % der Patienten eine Veränderung in acht untersuchten Krankheitsgenen gefunden werden (siehe Abb. 6).

Die Mehrzahl der in der Literatur beschriebenen Mutationen bei Patienten mit DCM finden sich lediglich bei einzelnen Patienten oder Familien. Meist handelt es sich um Missense-Mutationen aber auch Nonsense-Mutationen, Insertionen oder Deletionen wurden nachgewiesen. Trotz der großen Heterogenität der Genetik der DCM, ist die daraus resultierende Erkrankung überraschend homogen. Die DCM wird daher als gemeinsames Resultat einer Vielzahl von genetischen, autoimmunen und toxischen Noxen angesehen (Hershberger et al. 2010).

Nur selten ist für Krankheitsgene der DCM ein charakteristischer Phänotyp bekannt. Im Gegenteil, häufig kommt es durch einen Genotyp zu unterschiedlichen Phänotypen oder auch unterschiedliche Erkrankungen. So fand man in einer Familie neben Patienten mit DCM auch Familienmitglieder mit einer hypertrophen oder restriktiven Kardiomyopathie. Alle zeigten die gleiche Mutation im TNNT2 (Menon et al. 2008). Mutationen im LMNA können neben einer DCM auch zu einer Vielzahl von Fehlbildungen und Myopathien führen. Eine kardiale Beteiligung ist dabei meist in Form von Reizleitungsstörungen vorhanden, die DCM dagegen ist nicht obligat (Malhotra und Mason et al. 2009).

Auch eine Aussage über den klinischen Verlauf bei bekanntem Genotyp ist bei Krankheitsgenen der DCM in der Regel nicht zu treffen. Für Mutationen im TNNT2 wird zwar diskutiert, dass sie zu einem früheren Krankheitsbeginn und aggressiverem Verlauf der Erkrankung führen, aber auch hier ist bei Mutationsträgern eine Manifestation der Erkrankung in hohem Alter beschrieben (Hershberger et al. 2010).

Wie bei der großen Anzahl an Krankheitsgenen zu erwarten, ist die Prävalenz von Mutationen bezogen auf ein einzelnes Protein gering. Selbst bei den am häufigsten gefundenen Krankheitsgenen wie dem LMNA- oder dem MYH7-Gen liegt die in der Literatur beschriebene Prävalenz bei höchstens 6 % bzw. 4,2 %. Bei der Mehrzahl der etablierten Krankheitsgene wie zum Beispiel dem DES- (0,3 %) oder ACTC-Gen (0,5 %) liegt sie unter 1 % (Tesson et al. 2000, Taylor et al. 2007).

Das Vorkommen von mindestens zwei Mutationen im CHRM2-Gen in einer Gruppe von 337 Patienten entspricht einer Prävalenz von mindestens 0,6 % und ist damit mit der Prävalenz von anderen Krankheitsgenen der DCM vergleichbar.

4.2.2 Funktionsdomänen des m2AChR

Um eine Aussage über die möglichen Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion des Rezeptors treffen zu können, ist neben den biochemischen Veränderungen vor allem die Lokalisation der Mutation im Rezeptorprotein von Bedeutung. Durch Struktur- und Funktionsanalysen konnte für verschiedene Regionen des m2AChR die physiologische Funktion identifiziert werden.

Die Bindetasche des m2AChR für die orthotopen Liganden wird von den Transmembrandomänen II bis VI und der zweiten extrazellulären Schleife gebildet. Nach dem von Hibert 1991 vorgeschlagenen Modell spielen hier vor allem aromatische und saure Aminosäuren bei der Ligandenbindung eine Rolle. Zwar bestehen einige Unterschiede hinsichtlich der benötigten Aminosäuren für die Bindung von Agonisten und Antagonisten, die negativ geladene Aminosäure Asparagin103 scheint jedoch bei allen orthotopen Liganden für die Bindung essentiell zu sein (Heitz et al. 1999 und Mosser et al. 2002).

Aufgrund einer hochgradigen Konservierung der Aminosäuresequenz im Bereich der Ligandenbindetasche innerhalb der fünf muskarinergen Rezeptorsubtypen ist die Affinität der orthotopen Liganden zu den einzelnen Subtypen nahezu identisch.

Bei den allosterischen Liganden besteht im Gegensatz dazu ein signifikanter Unterschied. Die allosterische Bindedomäne liegt weiter extrazellulär als die orthotope Bindetasche, aber in direktem Kontakt zu dieser und wird von Aminosäuren der zweiten und dritten extrazellulären Schleife sowie der siebten Transmembrandomäne gebildet.

Allosterische Agonisten haben zu den m2AChR eine höhere Affinität als zu anderen Rezeptorsubtypen (M2>M3>M5). Der Austausch von korrespondierenden Aminosäuren der Bindedomänen des m5AChR mit denjenigen des m2AChR hat gezeigt, dass der Affinitätsunterschied hauptsächlich auf zwei Aminosäuren zurück zu führen ist. Zum einen Tyrosin177 in der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors und zum anderen Threonin423 in der siebten Transmembrandomäne (Buller et al. 2002 und Voigtländer et al. 2003).

Nachdem für die muskarinergen Rezeptorsubtypen M1, M3 und M5 gezeigt wurde, dass Mutationen in Nähe der sechsten Transmembrandomäne zu einem dauerhaft aktiven Rezeptor führen, konnte für den m2AChR ebenfalls durch einen Austausch von zwei Aminosäuren (Asparagin410Tyrosin und Threonin411Prolin) dieser Effekt gezeigt werden (Ford et al. 2002).

Neben der agonistenunabhängigen Aktivität zeigte sich bei den mutierten Rezeptoren eine erhöhte Bindungsaffinität der Agonisten im Vergleich zu Wildtyprezeptoren. Für die Aminosäure Asparagin410 gibt es Hinweise, dass sie agonistenabhängig die G-Protein Kopplung modifiziert und so möglicherweise auch die Funktion des Rezeptors verändern kann (Nelson et al. 2006).

Die dritte intrazelluläre Schleife ist mit 178 Aminosäuren mit Abstand der längste intrazelluläre Abschnitt des Rezeptors. Auch die übrigen Subtypen der mAChR und andere G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren wie Dopamin_{D2-4}- und alpha-adrenerge_{α2a-2c}-Rezeptoren besitzen eine lange dritte intrazelluläre Schleife mit über 100bp. Da die in dieser Arbeit nachgewiesenen Mutationen zu Aminosäureveränderungen im Bereich der dritten intrazellulären Schleife führen, ist die Funktion dieser Schleife für das Verständnis der möglichen Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion des m2AChR von besonderem Interesse.

Entgegen der großen Ähnlichkeiten zwischen den mAChR Subtypen, vor allem im Transmembranbereich, ist die Sequenz der dritten intrazellulären Schleife sehr heterogen.

Beim m2AChR reicht sie von Aminosäure 208 bis 386 und ist für die selektive Kopplung der G_i-Proteine verantwortlich. Es wurde vermutet, dass die G-Protein-Kopplung und Funktion der dritten intrazellulären Schleife von ihrer Sekundärstruktur abhängig ist. Strukturanalysen zeigten jedoch, dass der zentrale Teil der Schleife (Aminosäure 233 bis 380) keine fixierte Sekundärstruktur besitzt, sondern flexibel im Intrazellulärraum zu schwimmen scheint (Ichiyama et al. 2006).

Durch Mutationsanalysen weiß man, dass die vier Aminosäuren Valin385, Threonin386, Isoleucin389 und Leucin390 am n-terminalen Ende der dritten intrazellulären Schleife für die Bindung der G_{qi}-Untereinheit an den Rezeptor essentiell sind. Rezeptoren mit einer Deletion des zentralen Abschnitts der dritten intrazellulären Schleife (Aminosäure 268-324) zeigen dagegen keine Veränderung bei der Kopplung des G-Proteins (Liu et al. 1996).

Neben der G-Protein-Kopplung ist die dritte intrazelluläre Schleife für die Desensibilisierung und Internalisierung und damit für die Regulation der m2AChR von Bedeutung. Am m2AChR mit einer Deletion der Aminosäuren 234 bis 381 konnte gezeigt werden, dass eine Internalisierung ohne die dritte intrazelluläre Schleife nicht stattfindet und auch die Hemmung der Neusynthese des Rezeptors signifikant reduziert ist (Tsuga et al. 1998).

Dabei ist die Bindung des Proteins β-Arrestin an die dritte intrazelluläre Schleife des m2AChR sowohl für Internalisierung als auch Desensibilisierung essentiell. Kommt es nicht zu einer Bindung des Proteins an den m2AChR sind diese Regulationsmechanismen erheblich reduziert. Die Bindung von β-Arrestin und damit die physiologische Funktion der Regulationsmechanismen wird erst durch eine agonistenabhängigen Phosphorylierung von Serin/Threonin Residuen an den Positionen 286 bis 290 bzw. 308 bis 311 des Rezeptorproteins ermöglicht. Aber auch benachbarte saure Aminosäuren an Position 298 bis 300 bzw. 304 bis 305 im Rezeptorprotein sind hierfür von Bedeutung. Ohne sie findet keine Phosphorylierung der Serin/Threonin Residuen und folglich ebenfalls keine β-Arrestinbindung statt (Lee et al. 2000).

Im Bereich des c-terminalen Endes der dritten intrazellulären Schleife der mAChR-Subtypen M1 bis M3 ist eine konservierte Calmodulinbindestelle bekannt. Beim m1AChR liegt diese Bindestelle an Aminosäureposition 341 bis 368, beim m2AChR an Position 364 bis 391 und bei dem m3AChR an Position 467 bis 494.

Calmodulin ist ein 148 Aminosäuren umfassendes Protein, das für die Regulation des intrazellulären Calciumhaushaltes in Muskelzellen von Bedeutung ist. Für den m1AChR konnte gezeigt werden, dass eine zweite Calmodulinbindestelle unmittelbar n-terminal von dem oben genannten Peptidstück existiert (Aminosäure 313 bis 340). Wäre auch beim m2AChR eine weitere Bindestelle von Calmodulin n-terminal vorhanden, läge diese im Bereich der Mutation Glutamin358Histidin.

Bis heute ist keine Untersuchung des m2AChR auf eine weitere Calmodulinbindestelle publiziert. Allerdings werden für die Bindung von Calmodulin hydrophobe und basische Aminosäuren benötigt. Im Vergleich zum m1AChR enthält der entsprechende Abschnitt der dritten intrazellulären Schleife des m2AChR deutlich weniger basische und hydrophobe Aminosäuren, so dass eine Calmodulinbindestelle im Bereich der Mutationen unwahrscheinlich erscheint (Lucas et al. 2006).

Eine Infektion mit dem Parasiten *Trypanosoma cruzi* führt zur so genannten Chagas-Krankheit. Die akute Phase der Erkrankung verläuft meist ohne kardiale Beteiligung. Nach einer Latenz von bis zu 30 Jahren kann sich allerdings im Rahmen einer chronischen Phase in 25-30 % der Fälle eine DCM manifestieren. Als Ursache wird ein Antigen-Mimikri zwischen Proteinen des Parasiten und Antigenen am Herzen angenommen. Saure Aminosäuren in der zweiten extrazellulären Schleife des m2AChR ähneln immundominanten ribosomalen Proteinen des Parasiten. Dadurch interagieren körpereigene Immunglobuline mit der zweiten extrazellulären Schleife des m2AChR und können so die Kontraktilität vermindern sowie die Reizleitung am Herzen stören.

Die dritte intrazelluläre Schleife des m2AChR enthält wesentlich mehr saure Aminosäuren als die zweite extrazelluläre Schleife. Auch der Anteil an identischen Aminosäuren mit den ribosomalen Proteinen von *Trypanosoma cruzi* ist in der dritten intrazellulären Schleife deutlich höher (28,5 % vs. 10 %). Tatsächlich konnten in einer Arbeit auch Antikörper gegen die dritte intrazelluläre Schleife des m2AChR bei Patienten mit der Chagas-Erkrankung und nachfolgender DCM nachgewiesen werden (Retondaro et al. 1999).

Eine Rolle der Chagas-Antikörper bei den hier untersuchten Patienten ist allerdings nicht zu erwarten, da Infektionen mit *Trypanosoma cruzi* in den westeuropäischen Ländern selten sind. Die Tatsache, dass Antikörper gegen die dritte intrazelluläre Schleife bei Patienten mit DCM gefunden werden können ist aber ein Hinweis darauf, dass Mutationen in diesem Bereich durch die Veränderung von intrazellulären Prozessen bei der Entstehung der Erkrankung mitwirken können.

Insgesamt kann den Domänen der in dieser Arbeit gefundenen Mutationen in keiner der bis heute publizierten Studien eine definitive Funktion zugeordnet werden. Dementsprechend ist eine Aussage über die Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion des Rezeptors schwierig. Nach heutigem Kenntnisstand ist eine Störung der m2AChR-G-Protein-Interaktion und der intrazellulären Signaltransduktion am wahrscheinlichsten. Auch ein Einfluss auf die Regulationsmechanismen des Rezeptors wie Desensibilisierung oder Internalisierung ist denkbar.

4.2.3 Biochemische Auswirkungen der Mutationen

Ob eine Veränderung in der Basensequenz des Gens auch Auswirkungen auf die Funktion des Rezeptorproteins hat, ist davon abhängig, ob die Mutation nach der Translation zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führt.

Der Austausch der Base 651 von Cytosin zu Thymin führt im Protein zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz. Daher handelt es sich wahrscheinlich um einen Polymorphismus der möglicherweise keinen Bezug zur Erkrankung des Patienten hat. Anders verhält es sich mit den beiden gefundenen Missens-Mutationen.

Der Austausch von Guanin an Position 885 zu Adenosin bewirkt im Rezeptorprotein eine Änderung der Aminosäure 231 von Valin zu Isoleucin. Dabei wird eine aliphatische Aminosäure durch eine andere aliphatische Aminosäure ersetzt. Aliphatische Aminosäuren sind für die Ausbildung hydrophober Wechselwirkung innerhalb von Proteinen von Bedeutung. Da Valin und Isoleucin nahezu identische chemische Eigenschaften besitzen, ist auch für die Rezeptorfunktion unter chemischen Gesichtspunkten keine Veränderung zu erwarten. Allerdings hat Isoleucin einen längeren Seitenarm als Valin. Dies könnte die Struktur des Rezeptorproteins verändern und so die Funktion beeinflussen. Geht man aber wie in Kapitel 4.2.2. beschrieben von einer flexiblen Sekundärstruktur der dritten intrazellulären Schleife aus, haben gerade kleine Veränderungen der Struktur eher keinen Einfluss auf die Funktion des Rezeptors.

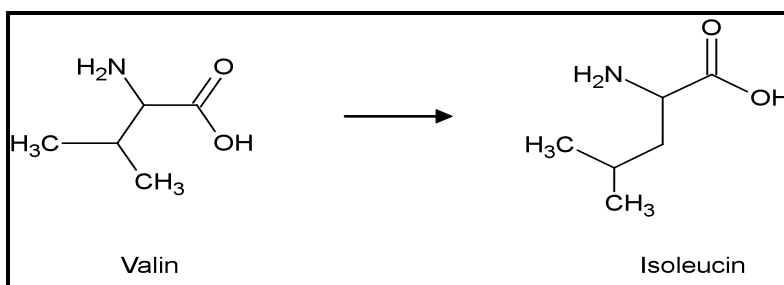


Abb. 23: Aminosäureaustausch der Mutation G885A.

Bei der zweiten Missense-Mutation wird Guanin durch Cytosin ersetzt. Das Basentriplett, das für die Aminosäure an Position 358 kodiert, ändert sich dabei von CAC zu CAG, wobei die neutrale Aminosäure Glutamin durch die basische Aminosäure Histidin ersetzt wird.

Histidin ist die Einzige der proteinogenen Aminosäuren mit einem isoelektrischen Punkt bei einem pH-Wert von 7,6. Sie kann unter physiologischen Bedingungen sowohl als Protonendonator als auch als Protonenakzeptor fungieren. Histidin spielt daher besonders bei Puffereigenschaften von Proteinen eine wichtige Rolle. Bei der Substitution von nur einem Histidin ist hinsichtlich der Puffereigenschaften jedoch keine Veränderung zu erwarten. Eine Veränderung der Bindungseigenschaften und damit der biochemischen Funktion des Rezeptors wäre allerdings denkbar.

Poly Phen-2 ist ein im Internet frei verfügbares Programm, das mit Hilfe von biochemischen und physikalischen Berechnungen sowie durch Vergleichsanalysen einen Hinweis auf die funktionellen Effekte von SNPs in einem Protein geben kann (Adzuhbei et al. 2010, www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2). Eine Analyse der gefundenen Mutationen via PolyPhen-2 zeigt, dass der Austausch von Valin zu Isoleucin an Position 231 im Rezeptorprotein benigne zu sein scheint (Score von 0,0). Die Substitution von Glutamin zu Histidin an Position 358 stellt dagegen wahrscheinlich eine maligne Mutation dar (Score: 0,906; Sensitivität: 0,78; Spezifität: 0,91).

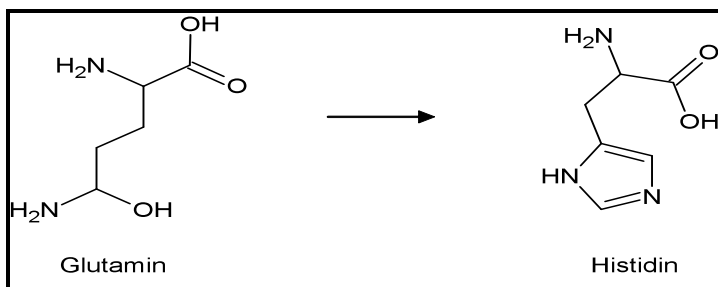


Abb. 24: Aminosäureaustausch der Mutation G1268C.

4.2.4 Rolle des m2AChR in der Pathogenese der DCM

Die Mehrzahl der bis heute bekannten Krankheitsgene der DCM kodieren für kardiale Proteine der Krafterzeugung oder Kraftübertragung. Eine Störung der Mechanotransduktion führt dabei zu einer reduzierten Stresstoleranz des Herzens und schließlich zur Entwicklung einer DCM. Erst im Zuge weiterer Untersuchungen wurde klar, dass auch Störungen der kardialen Elektrolythomöostase Einfluss auf die Kontraktilität des Herzens nehmen können und die Entstehung einer DCM begünstigen.

Aktuell zählen mit dem Natriumkanal Typ 5 (SCN5A), dem K⁺-Einwärtsgleichrichterkanal (ABCC9) und dem Phospholamban mehrere Ionenkanäle bzw. deren Regulatoren zu den Krankheitsgenen der DCM (Bienengraeber et al. 2004; McNair et al. 2004; Schmitt et al. 2003).

Anhand von Mutationen im Phospholamban wurde gezeigt, dass Störungen der Calciumhomöostase zu einer DCM führen können. Phospholamban hemmt die SERCA2a-Kanäle in Kardiomyozyten und reduziert so die Calciumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum. Das bedeutet, dass letztendlich ein größerer Anteil des intrazellulären Calciums nach extrazellulär transportiert wird und die Kontraktionskraft der Herzmuskelzelle abnimmt. Ist die Phospholambanaktivität gesteigert, kommt es dadurch zu einer gestörten Funktion des Herzmuskels (Schmitt et al. 2003).

Eine Phosphorylierung von Serin/Threonin Residuen im Phospholamban, beispielsweise durch β -adrenerg vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A, hemmt dessen Aktivität. Der m2AChR als Gegenspieler dieser sympatischen Aktivierung kann diese Phosphorylierung hemmen und so die Aktivität des Phospholamban beeinflussen (MacLennan et al. 2003).

Es scheint erwiesen, dass Störungen des intrazellulären Calciumhaushaltes der Kardiomyozyten zu einer DCM führen können. Die m2AChR nehmen durch ihre Wirkung sowohl auf die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle an der Zellmembran als auch auf die sarkoplasmatischen SERCA2a-Kanäle Einfluss auf die intrazelluläre Calciumhomöostase. Ist die Funktion der m2AChR durch genetische Veränderungen gestört, könnte dies folglich eine DCM begünstigen.

Auch K^+ -Einwärtsgleichrichterkanäle spielen eine Rolle bei der Regulation der intrazellulären Calciumhomöostase. Daneben sind sie für die Stresstoleranz des Herzens von Bedeutung. Mit dem ABCC9-Gen zählt das Gen einer regulatorischen Untereinheit eines K^+ -Einwärtsgleichrichterkanals zu den Krankheitsgenen der DCM (Bienengraeber et al. 2004).

Die m2AChR sind an der Aktivierung von K^+ -Einwärtsgleichrichterkanälen beteiligt und könnten durch Veränderungen der Rezeptorfunktion Einfluss auf die Stresstoleranz des Herzens und damit auf die Entstehung einer DCM nehmen. Des Weiteren wird die parasympathische Innervation des Herzens nahezu vollständig über m2AChR vermittelt. Eine eingeschränkte Aktivität der m2AChR könnte zu einer Dysregulation der kardialen autonomen Innervation führen und der fehlende protektive Effekt des Parasympatikus das Herz zusätzlich empfindlich für stressinduzierte Schäden machen.

Einige Hypothesen für die Rolle des m2AChR in der Pathogenese der DCM existieren, es fehlen allerdings bisher Ergebnisse funktioneller Untersuchungen, die diese Hypothesen stützen.

Um zu klären, ob die gefundenen Mutationen die Funktion des Rezeptors beeinflussen und für die Entstehung einer DCM prädisponieren, bedarf es im weiteren Verlauf genau dieser Funktionsanalysen. Die durch beide nachgewiesenen Mutationen veränderten Aminosäuren sind bei allen bisher untersuchten Säugetieren konserviert, so dass auch Untersuchungen an Tiermodellen denkbar sind.

4.2.5 Vergleich der Ergebnisse mit den Schlussfolgerungen von Zhang et al.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neue Missense-Mutationen im CHRM2-Gen bei Patienten mit DCM gefunden. Die Ergebnisse unterstützen die Rolle des CHRM2-Gens als weiteres Krankheitsgen der DCM.

Im Gegensatz zu der von Zhang et al. beschriebenen Mutation bewirken die beiden in dieser Arbeit nachgewiesenen Mutationen einen Aminosäureaustausch im Bereich der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors. Aufgrund der aktuellen Kenntnisse zur physiologischen Funktion der dritten intrazellulären Schleife des m2AChR scheint der von Zhang et al. vermutete Einfluss auf die Ligandenbindung bei den hier nachgewiesenen Mutationen unwahrscheinlich.

Während die Mutationsträger bei Zhang et al. ein reduziertes 3-Jahresüberleben zeigten, fanden sich bei den in dieser Arbeit identifizierten Mutationsträgern keine Hinweise auf einen progressiven Verlauf der Erkrankung. Ein Vergleich der EF und des LVEDD der Mutationsträger mit den klinischen Daten der übrigen untersuchten Patienten ergab weder bei Einschluss noch im 1-Jahresverlauf signifikante Unterschiede (siehe Tab. 10). Allerdings ist der Beobachtungszeitraum der Patienten im Rahmen des BMBF-Projektes kürzer und durch die geringe Anzahl an Mutationsträgern eine Aussage zusätzlich erschwert.

Die Unterschiede in den Ergebnissen stehen jedoch nicht im Widerspruch zu einer Rolle der hier vorgestellten Mutationen oder des CHRM2-Gens bei der Pathogenese der DCM, sondern entsprechen viel mehr dem Bild von anderen bekannten Krankheitsgenen.

Insgesamt passt die Identifikation von Mutationen im CHRM2-Gen bei Patienten mit DCM in das Konzept der großen genetischen Heterogenität der Erkrankung. Die Identifizierung von immer neuen Krankheitsgenen zeigt, dass weitere genetische Forschung für das Verständnis der Pathogenese der DCM nötig ist. Hershberger et al. vermuten, dass momentan nur etwa 30 % aller relevanten Krankheitsgene identifiziert sind.

Ebenso ist allerdings offensichtlich, dass genetische Ursachen alleine nicht ausreichen, um die Pathogenese der Erkrankung vollständig zu erklären. Obwohl bereits auch eine Vielzahl an exogenen Faktoren bekannt sind, wird bei 50 % der Erkrankten keine krankheitsauslösende Ursache identifiziert. Es müssen also weitere bisher unbekannte Faktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Erkrankung spielen. Diese gilt es im Rahmen der weiteren Forschung zu identifizieren, um die Pathogenese der DCM vollständig zu verstehen und so die Therapie der Patienten zu verbessern und die Mortalität zu senken.

5 Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine ätiologisch heterogene Erkrankung der Herzmuskulatur, die durch eine ventrikuläre Dilatation und eingeschränkte Pumpfunktion gekennzeichnet ist. Neben autoimmunen und infektiösen Faktoren spielen bei der Pathogenese der Erkrankung vor allem genetische Veränderungen eine Rolle.

In den letzten Jahren konnten durch molekularbiologische Untersuchungen Mutationen in über 30 Krankheitsgenen bei Patienten mit DCM identifiziert werden. Neben Proteinen des Sarkomers und des Zytoskeletts zählen auch Rezeptorproteine und deren Regulatoren hierzu.

Das CHRM2-Gen ist ein neues mögliches Krankheitsgen der DCM. Es befindet sich auf Chromosom 7_{31q-35q} und kodiert für den muskarinergen Acetylcholinrezeptor Typ 2 (m2AChR).

Der m2AChR ist der vorherrschende muskarinerge Rezeptor am Herzen und vermittelt über sein G_i-Protein eine Reduktion der intrazellulären cAMP Konzentration. Dies senkt den Calciumeinstrom in die Myokardzelle und hat einen negativ inotropen und chronotropen Effekt. In einer Arbeit von Zhang et al. konnte bereits bei einer Familie mit familiärer DCM eine Missense-Mutation im m2AChR bei allen erkrankten Familienmitgliedern nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Mutationen in der kodierenden Region des CHRM2-Gens bei Patienten mit DCM zu identifizieren und einen möglichen Einfluss der Mutationen auf den klinischen Verlauf der Erkrankung zu untersuchen. Hierfür wurde aus Vollblutproben von 337 an DCM erkrankten Patienten der kodierende Abschnitt des CHRM2-Gens mittels Polymeraserkettenreaktion (PCR) und single-stranded-conformation-polymorphism Gelelektrophorese (SSCP) molekularbiologisch untersucht. In der SSCP auffällige Proben wurden sequenziert. Anamnestische Daten der Patienten sowie die Ergebnisse klinisch-echokardiographischer Untersuchungen bei Einschluss der Patienten und im 1-Jahresverlauf liegen vor.

In der untersuchten Patientengruppe konnten zwei neue heterozygote Missense-Mutationen sowie ein Polymorphismus identifiziert werden. Die Missense-Mutation G885A bewirkt einen Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin an Position 231 im Rezeptorprotein. Durch die Mutation G1268C wird Glutamin durch Histidin an Position 358 ersetzt. Bei dem Träger dieser Mutation liegt eine familiäre Form der DCM vor und ein ebenfalls an DCM erkrankter Sohn des Indexpatienten konnte als weiterer Träger identifiziert werden. Hinsichtlich der echokardiographischen Daten, besonders im 1-Jahresverlauf, konnten bei keinem Mutationsträgern Unterschiede zu Patienten mit DCM ohne nachgewiesene Mutation gefunden werden.

Die anschließende Untersuchung einer Kontrollgruppe aus 300 gesunden Blutspendern der Blutbank Marburg identifizierte keine weiteren Träger der Mutationen.

Beide Mutationen bewirken eine Veränderung der Aminosäuresequenz in der dritten intrazellulären Schleife des m2AChR. Dieser Bereich ist für die Kopplung des Rezeptors an sein G-Protein und die Regulation der Rezeptordichte bzw. der Rezeptorfunktion von Bedeutung. Eine Auswirkung der Mutationen auf die intrazellulären Signaltransduktion und Calciumhomöostase ist denkbar.

Insgesamt unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Rolle des CHRM2-Gens als weiteres Krankheitsgen der DCM. Die hier gezeigte Prävalenz von 0,6 % ist mit der Prävalenz von anderen etablierten Krankheitsgenen vergleichbar. Zum Verständnis der Rolle des CHRM2-Gens in der Pathogenese der DCM und um die Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion des Rezeptorproteins abschließend zu klären, sind funktionelle Untersuchungen der mutierten Rezeptoren notwendig.

6 Abstract

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a heterogeneous heart muscle disease characterized by ventricular dilatation and impaired function of the heart. Despite autoimmune and infectious factors genetic changes play a major role in the pathogenesis of this disease.

In the last few years mutations in over 30 different genes were identified in patients with DCM. Most were found in genes coding for proteins of the sarcomere or cytoskeletal proteins but mutations in receptors or their regulatory proteins were detected as well.

The CHRM2-gene is a potential new disease gene of DCM. It is localized on chromosome 7_{31q-35q} and is coding for the muscarinic acetylcholin receptor type 2 (m2AChR).

The m2AChR is the main muscarinic receptor in the mammalian heart and mediates a reduction of the intracellular cAMP concentration through the G_i-protein. Calcium influx into the myocardial cell is reduced resulting in negative inotrope and chronotrope effects. In a study of Zhang et al. one missense mutation in the CHRM2-gene was found in all affected members of a family with familial DCM.

The purpose of this study was to identify further mutations in the coding region of the CHRM2-gene in patients with DCM and to explore the influence of these mutations on the clinical course of the disease. Therefore we screened the coding region of the CHRM2-gene with polymerase chain reaction (PCR) and single-stranded-conformation-polymorphism gelelectrophoresis (SSCP) in 337 patients with DCM. The DNA of patients with conspicuous findings in the SSCP was analyzed by direct sequencing. Informations of an echocardiographic examination at the time of admission and at an one year follow-up are documented.

In the investigated group of patients with DCM we could identify two new heterozygous missense mutations and one polymorphism in the CHRM2-gene. As a result of the mutation G885A the aminoacid valin is changed to isoleucin at position 231 of the receptor protein. The effect of the mutation G1268C is a substitution of glutamin by histidine at position 358. The diagnosis of familial DCM was confirmed for the carrier of this mutation because the diagnosis of DCM was established in one son of the indexpatient. The mutation G1268C was found in the DNA of the son as well. A correlation between the identified mutations and the results of the echocardiographic examination of the carriers, especially at the one year follow-up, could not be observed.

In a following screening of 300 healthy blood donors from the Marburger Blutbank no further carriers of the mutations were found.

The effect of both mutations is an aminoacid change at the third intracellular loop of the m2AChR. This area is important for the receptor-G-protein-coupling and for the regulation of the receptor concentration at the cell surface or rather the regulation of the receptor function. An influence on the intracellular signal transduction and calcium homeostasis is possible.

Taken together, the results of this study support the role of the CHRM2-gene in the pathogenesis of DCM. A prevalence of 0,6 % is comparable with the prevalence of established disease genes in DCM. For a complete understanding of the role of the CHRM2-gen in the pathogenesis of DCM and to clarify the effect of the mutations on the function of the m2AChR further functional analysis of the mutated receptor is required.

Literaturverzeichnis

Adzhubei I A, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky V E, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov A S and Sunyaev S R. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7(4):248-249, *Nat Methods*, 2010; 7(4):248-249.

Afzal S und Kristensen I B. Characterization of cardiomyopathy cases at a forensic institute in the period 1992-2006 and perspectives for screening. *Forensic Sci Med Pathol*, 2008 , 4(2):108–112.

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P und Jaenicke L. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, 2011; 4. Auflage 561ff.

Badner J A, Yoon S W, Turner G, Bonner T I und Detera-Wadleigh S D. Multipoint genetic linkage analysis of the M2 human muscarinic receptor gene. *Mamm Genom*, 1995; 6(7):489-490.

Bänkler H W, Arasteh K und Bieber C (Hrg.). *Duale Reihe Innere Medizin*, Georg Thieme Verlag, 2009.

Bienengaeber M, Olson T M, Selivanov V A, Kathmann E C, O’Cochlaine F, Gao F, Karger A B, Bellow J D, Hodgson D M, Zingman L V, Pang Y, Alekseev A E und Terzic A. ABCC9 mutation identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic K_{ATP} channel gating. *Nat Genet*, 2004; 36:382-387.

Buller S, Zlotos D P, Mohr K und Ellis J. Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: a single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine V derivatives und alkane-bisammonium ligands. *Mol Pharmacol*, 2002; 61(1):160–168.

Caforio A L P, Mahon N G, Baig M K, Tona F, Murphy R T, Elliott P M und McKenna William J. Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives. *Circulation*, 2007; 115(1):76–83.

Caforio A L P, Mahon N J, Tona F und McKenna William J. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail*, 2002; 4(4):411–417.

Caulfield M P. Muscarinic receptors – characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther*, 1993; 58(3):319–379.

Caulfield M P und Birdsall N J. International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev*, 1998; 50(2):279–290.

Carballeira N, Nazabal M, Brito J und Garcia O. Purification of a thermostable DNA polymerase from *thermus thermophilus* HB8, useful in the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 1990; 9:276-281.

Clarke A M T, Mapstone N P und Quirke P. Molecular biology made easy: the polymerase chain reaction. *Histochem J*, 1992; 24(12):913-926.

Cohen-Woods S, Gaysina D, Craddock N, Farmer A, Gray J, Gunasinghe C, Hoda F, Jones L, Knight J, Korszun A, Owen M J, Sterne A, Craig I W und McGuffin P. Depression Case Control (DeCC) study fails to support involvement of the muscarinic acetylcholine receptor M2 (CHRM2) gene in recurrent major depressive disorder. *Hum Mol Genet*, 2009; 18(8):1504–1509.

Comings D E, Wu S, Rostamkhani M, McGue M, Lacono W G, Cheng L S-C und MacMurray J P. Role of the cholinergic muscarinic 2 receptor (CHRM2) gene in cognition. *Mol Psychiatry*, 2003; 8(1):10–11.

Comings D E, Wu S, Rostamkhani M, McGue M, lacono W G und MacMurray J P. Association of the muscarinic cholinergic 2 receptor (CHRM2) gene with major depression in women. *Am J Med Genet*, 2002; 114(5):527–529.

Connolly S J, Hallstrom A P, Cappato R, Schron E B, Kuck K H, Zipes D P, Greene H L, Boczor S, Domanski M, Follmann D, Gent M und Roberts R S. Meta-analysis of the implantable cardioverter defibrillator secondary prevention trials. *Eur Heart J*, 2000; 21(24):2071-2078.

Cooper L T, Baughman K L, Feldman A M, Frustaci A, Jessup M, Kuehl U, Levine G N, Narula J, Starling R C, Towbin J und Virmani R. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease. *Eur Heart J*, 2007; 28:3076-3093.

Davie A P, Francis C M, Love M P, Caruana L, Starkey I R, Shaw T R D, Sutherland G R und McMurray J J V. Value of electrocardiogram in identifying heart failure due to left ventricular systolic dysfunction. *BMJ*, 1996; 312(7025):222.

Diet F und Erdmann E. Thromboembolism in heart failure: who should we treat? *Eur J Heart Fail*, 2000; 2(4):355:363.

Dhein S, van Koppen C J und Brodde O E. Muscarinic receptors in the mammalian heart. *Pharmacol Res*, 2001; 44(3):161–182.

Dick D M, Agrawal A, Wang J C, Hinrichs A, Bertelsen S, Bucholz K, Schuckit M, Kramer J, Nurnberger J, Tischfield J, Edenberg H J, Goate A und Bierut L J. Alcohol dependence with comorbid drug dependence: genetic and phenotypic associations suggest a more severe form of the disorder with stronger genetic contribution to risk. *Addiction*, 2007; 102(7):1131–1139.

Dick D M, Aliev F, Kramer J, Wang J C, Hinrichs A, Bertelsen S, Kuperman S, Schuckit M, Nurnberger J, Edenberg H J, Porjesz B, Begleiter H, Hesselbrock V, Goate A und Bierut L. Association of CHRM2 with IQ: converging evidence for a gene influencing intelligence. *Behav Genet*, 2007; 37(2):265–272.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray J, Ponikowski P, Poole-Wilson P A, Strömberg A, van Veldhuisen D J, Atar D, Hoes A W, Keren A, Mebazzaa A, Nieminen M, Priori S G und Swedberg K. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail*, 2008; 10(10):933–989.

Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kühl U, Maisch B, McKenna W J, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L und Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*, 2008; 29(2):270–276.

Faris R, Flather M, Purcell H, Henein M, Poole-Wilson P und Coats A. Current evidence supporting the role of diuretics in heart failure: a meta analysis of randomised controlled trials. *Circulation*, 2002; 82(2):149-158.

Fatkin D und Graham R M. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev*, 2002; 82(4):945–980.

Fatkin D und C.S.A.N.Z. Cardiovascular Genetics Working Group. Guidelines for the diagnosis and management of familial dilated cardiomyopathy. *Heart Lung Circ*, 2007; 16(1):19–21.

Felix S B, Dörr M, Herda L R, Beug D und Staudt A. Immunabsorption als Therapieverfahren der dilatativen Kardiomyopathie. *Internist*, 2008; 49:51-56.

Fenech A G, Billington C K, Swan C, Richards S, Hunter T, Ebejer M J, Felice A E, Ellul-Micallef R und Hall I P. Novel polymorphisms influencing transcription of the human CHRM2 gene in airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004; 30(5):678–686.

Fonseca C, Mota T, Morais H, Matias F, Costa C, Oliviera A G und Ceia F. The value of the electrocardiogram and chest x-ray for confirming or refuting a suspected diagnosis of heart failure in the community, *Eur J Heart Fail*, 2004; 6(6):807-812.

Ford D J, Essex A, Spalding T A, Burstein E S und Ellis J. Homologous mutations near the junction of the sixth transmembrane domain and the third extracellular loop lead to constitutive activity and enhanced agonist affinity at all muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002; 300(3):810–817.

Frey N und Katus H A. Dilated cardiomyopathy as a genetic disease: molecular and clinical aspects. *Internist (Berl)*, 2008; 49(1):43–50.

Frustaci A, Russo M A und Chimenti C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *Eur heart J*, 2009; 30(16):1995-2002.

- Fu M L. Anti-M2 muscarinic receptor autoantibodies and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, 1996; 54(2):127–135.
- Fu M L, Hoebeke J, Matsui S, Matoba M, Magnusson Y, Hedner T, Herlitz H und Hjalmarson A. Autoantibodies against cardiac g-protein-coupled receptors define different populations with cardiomyopathies but not with hypertension. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994; 72(1):15–20.
- Fujita K und Silver J. Singel-stranded conformation polymorphism. *Genome Res*, 1994; 4:137–140.
- Gibbons A S, Scarr E, McLean C, Sundram S und Dean B. Decreased muscarinic receptor binding in the frontal cortex of bipolar disorder and major depressive disorder subjects. *J Affect Disord*, 2009; 116(3):184–191.
- Glavac D und Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism technique for the detection of point mutations. *Hum Mutat* 1993; 2:404–414.
- Gosso M F, deGeus E J C, Polderman T J C, Boomsma D I, Posthuma D und Heutink P. Exploring the functional role of the CHRM2 gene in human cognition: results from a dense genotyping and brain expression study. *BMC Med Genet*, 2007; 8:66.
- Gosso M F, van Belzen M, deGeus E J C, Polderman J C, Heutink P, Boomsma D I und Posthuma D. Association between the CHRM2 gene and intelligence in a sample of 304 dutch families. *Genes Brain Behav*, 2006; 5(8):577–584.
- Gregory K J, Hall N E, Tobin A B, Sexton P M und Christopolus A. Identification of orthosteric and allosteric site mutations in M2 muscarinic acetylcholine receptors that contribute to ligand-selective signaling bias. *J Biol Chem*, 2010; 285(10):7459–74.
- Grünig E, Benz A, Mereles D, Unnebrink K, Kücherer H, Haass M, Kübler W und Katus H A. Prognostic value of serial cardiac assessment and familial screening in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*, 2003; 5(1):55–62.
- Hautala A J, Rankinen T, Kiviniemi A M, Mälikallio T H, Huikuri H V, Bouchard C und Tulppo M P. Heart rate recovery after maximal exercise is associated with acetylcholine receptor M2 (CHRM2) gene polymorphism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006; 291(1):H459–H466.
- Hautala A J, Tulppo M P, Kiviniemi A M, Rankinen T, Bouchard C, Mälikallio T H und Huikuri H V. Acetylcholine receptor M2 gene variants, heart rate recovery, and risk of cardiac death after an acute myocardial infarction. *Ann Med*, 2009; 41(3):197–207.
- Hayashi K und Yandell D W. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat*, 1993; 2(5):338–346.
- Heitz F, Holzwarth J A, Gies J P, Pruss R M, Trumpp-Kallmeyer S, Hibert M F und Guenet C. Site-directed mutagenesis of the putative human muscarinic M2 receptor binding site. *Eur J Pharmacol*, 1999; 380(2-3):183–195.
- Henry W L, Gardin J M, Ware J H, Philips A V und Cooper T A. Echocardiographic measurements in normal subjects from infancy to old ag., *Circulation*, 1980 62(5):1054–61.

Hershberger R E, Pinto J R, Parks S B, Kushner J D, Li D, Ludwigsen S, Cowan J, Morales A, Parvatiyar M S und Potter J D. Clinical and functional characterization of TNNT2 mutations identified in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009; 2(4):306–313.

Hershberger R E, Lindenfeld J, Mestroni L, Seidman C E, Taylor M R, Towbin J A und the Heart Failure Society of America. Genetic evaluation of cardiomyopathy - a Heart Failure Society of America practice guideline. *J Card Fail*, 2009; 15:83-87.

Hershberger R E, Morales A, Norton N und Siegfried J. Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: a review for genetics professionals. *Genet in Med*, 2010; 12:655-667.

Hershberger R E, Norton N, Morales A, Duanxiang L, Siegfried J und Gonzales-Guintana J. Coding sequence rare variants indentified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1 and TNNI3 from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010; 3:155-161.

Hibert M F, Trumpp-Kallmeyer S, Bruinvels A und Hoflack J. Three-dimensional models of neurotransmitter g-binding protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol*, 1991; 40(1):8–15.

Höltje H-D und Jöhren K. A model of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor. *Journal of Computer Aided Molecular Design*, 2002; 16:795–801.

Ichiyama S, Oka Y, Haga K, Kojima S, Tateish Y, Shirakawa M und Haga T. The structure of the third intracellular loop of the muscarinic acetylcholine receptor M2 subtype. *FEBS Lett*, 2006; 580(1):23–26.

Janning W und Knust E. *Genetik*. Georg Thieme Verlag 2008; 261ff.

Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, Angelicheva D, Haworth A, Casals T und Kremensky I. SSCP analysis: a blind sensitivity trial. *Hum Mutat*, 1997; 10(1):65–70.

Kameyama K, Haga K, Haga T, Moro O und Sadée W. Activation of a GTP-binding protein and a GTP-binding-protein-coupled receptor kinase (beta-adrenergic-receptor kinase-1) by a muscarinic receptor M2 mutant lacking phosphorylation sites. *Eur J Biochem*, 1994; 226(2):267–276.

Karatolios K, Pankuweit S und Maisch B. Diagnosis and treatment of myocarditis: the role of endomyocardial biopsy. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2007; 9(6):473-481

Karlsruhe Institute of Technology. Bioinformatic Harvester IV, www.harvester.fzk.de/harvester.

Kompetenznetz Herzinsuffizienz. www.knhi.de.

Kohlmann J und Rhöm K H. *Taschenatlas der Biochemie*, George Thieme Verlag, 2002; 258ff.

Komajda M, Jais J P, Reeves F, Goldfarb B, Bouhour J B, Juillieres Y, Lanfranchi J, Peycelon P, Geslin P und Carrie D. Factors predicting mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 1990; 11(9):824–831.

- Konstantinos K V, Plageras P, Vlachos T A, Papaioannou A und Noulas V A. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Mol Biotechnol*, 2008; 38(2):155–163.
- Korbie D J und Mattick J S. Touchdown-PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification *Nat Protoc*, 2008; 3(9):1452-1456.
- Kühl U, Pauschinger M, Seeborg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W und Schultheiss H-P. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation*, 2005; 112(13):1965–1970.
- Kukita Y, Tahira T, Sommer S S und Hayashi K. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum Mutat*, 1997; 10(5):400–407.
- LaCroix C, Freeling J, Giles A, Wess J und Li Y-F. Deficiency of M2 muscarinic acetylcholine receptors increases susceptibility of ventricular function to chronic adrenergic stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008; 294(2):H810–H820.
- Lee K B, Ptasienski J A, Bunemann M und Hosey M M. Acidic amino acids flanking phosphorylation sites in the M2 muscarinic receptor regulate receptor phosphorylation, internalization and interaction with arrestins. *J Biol Chem*, 2000; 275(46):35767–35777.
- Lind P A, Michelle L, Horan M A, Marioni R E, Wright M J, Bates T C, Rabitt P, Harris S E, Davidson Y , Deary I J, Gibbons L, Pickles A, Ollier W, Pendleton N, Price J F, Payton A und Martin N G. No association between cholinergic muscarinic receptor 2 (CHRM2) genetic variation and cognitive abilities in three independent samples. *Behav Genet*, 2009; 39(5):513–523.
- Liu J, Blin N, Conklin B R und Wess J. Molecular mechanisms involved in muscarinic acetylcholine receptor-mediated G-protein activation studied by insertion mutagenesis. *J Biol Chem*, 1996; 271(11):6172–6178.
- Lucas J L, Wang D und Sadée W. Calmodulin binding to peptides derived from the i3-loop of muscarinic receptors. *Pharm Res*, 2006; 23(4):647–653.
- Luk A, Ahn E, Soor G S und Butany J. Dilated cardiomyopathy: a review. *J Clin Pathol*, 2009; 62(3):219–225.
- Luo X, Kranzler H R, Zuo L, Wang S, Blumberg H P und Gelernter J. CHRM2 gene predisposes to alcohol dependence, drug dependence and affective disorders: results from an extended case-control structured association study. *Hum Mol Genet*, 2005; 14(16):2421–2434.
- Luo X, Kranzler H R, Zuo L, Zhang H, Wang S und Gelernter J. CHRM2 variation predisposes to personality traits of agreeableness and conscientiousness. *Hum Mol Genet*, 2007; 16(13):1557–1568.
- MacLennan D H und Kranias E G. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003; 4(7):566–577.

Maisch B, Deeg P, Liebau G und Kochsiek K. Diagnostic relevance of humoral and cytotoxic immune reactions in primary and secondary dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 1983; 52(8):1072-1078.

Maisch B, Hufnagel G, Kölsch S, Richter A, Rupp H, Herzum M und Pankuweit S. Treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy and (peri)myocarditis with immunosuppression and i.v. immunoglobulins. *Herz*, 2004; 29(06):624-636.

Maisch B, Richter A, Sandmöller A, Portig I, Pankuweit S und das BMBF-Heart Failure Network. Inflammatory dilated cardiomyopathy (DCMI). *Herz*, 2005; 30(6):535-544.

Maisch B, Ristic A D, Portig I und Pankuweit S. Human viral cardiomyopathy. *Front Biosci*, 2003; 8:s39-67.

Maisch B, Ristic A D und Hufnagel G, Funck R, Alter P, Tontsch D und Pankuweit S. Dilated cardiomyopathies as a cause of congestive heart failure. *Herz*, 2002; 27(2):113-134.

Malhotra R und Mason P. Lamin a/c deficiency as a cause of familial dilated cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol*, 2009; 24:203-208.

Maron B J, Towbin J A, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss A J, Seidman C E und Young J B. American Heart Association, Heart Failure Council on Clinical Cardiology, Transplantation Committee, Quality of Care, Outcomes Research, Functional Genomics, Translational Biology Interdisciplinary Working Groups, Council on Epidemiology and Prevention. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 2006; 113(14):1807–1816.

Mason Jay W. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc Res*, 2003; 60(1):5–10.

McKusick AV et al. Online Mendelian Inheritance in Man, www.ncbi.nlm.nih.gov/omim.

Mc Murray J, Cohen-Solal A, Dietz R, Eichhorn E, Erhardt L, Hobbs R, Krum H, Maggioni A, McKelvie R S, Pina IJ, Soler-Soler J und Swedberg K. Practical recommendations for the use of ACE inhibitors, beta-blockers, aldosterone antagonists and angiotensin receptor blockers in heart failure. *Eur J Heart Fail*, 2005; 7(5):710-721.

McNair W P, Ku L, Taylor M, Fain P R, Dao D, Wolfel E, Mestroni L und the Familial Cardiomyopathy Research Group. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder and arrhythmia. *Circulation*, 2004; 110(15):2163-2167.

Menon S C, Michels V V, Pellikka P A, Ballew J D, Karst M L, Herron K J, Nelson S M, Rodeheffer R J und Olson T M. Cardiac troponin T mutation in familial cardiomyopathy with variable remodelling and restrictive physiology. *Clin Genet*, 2008; 74:445-454.

- Mestroni L, Maisch B, McKennat W C, Schwartz K, Charron P, Rocco C, Tesson F, Richter A, Wilke A und Komjanda M. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. *Eur Heart J*, 1999; 20:93-102.
- Michels V V, Moll P P, Miller F A, Tajik A J, Chu J S, Driscoll D J, Burnett J C, Rodeheffer R J, Chesebro J H und Tazelaar H D. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 1992; 326(2):77–82.
- Mobascher A, Rujescu D, Mittelstraß K, Giegling I, Lamina C, Nitz B, Brenner H, Fehr C, Breitling L P, Gallinat J, Rothenbacher D, Raum E, Müller H, Ruppert A, Hartmann A M, Möller H J, Gal A, Gieger C, Wichmann H E, Illig T, Dahmen N und Winterer G. Association of a variant in the muscarinic acetylcholine receptor 2 gene (CHRM2) with nicotine addiction. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2010; 153B(2):684-690.
- Mosser V A, Amana I J und Schimerlik M I. Kinetic analysis of M2 muscarinic receptor activation of Gi in Sf9 insect cell membranes. *J Biol Chem*, 2002; 277(2):922–931.
- Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Springer, 2009; 58ff, 90ff.
- Mullis K, Fallona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986; 51(1):263-273.
- Nelson C P, Nahorski S R und Challiss R A J. Constitutive activity and inverse agonism at the M2 muscarinic acetylcholine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006; 316(1):279–288.
- Newton C R. *PCR Labor im Fokus*. Spektrum Akademischer Verlag, 1997.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K und Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989; 86(8):2766–2770.
- Pals-Rylaarsdam R, Gurevich V V, Lee K B, Ptasienski J A, Benovic J L und Hosey M M. Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor. arrestin-independent and -dependent pathways. *J Biol Chem*, 1997; 272(38):23682–23689.
- Pan Q, He Y, Zhang Z, Liu Y, Zhou Q, Li J, Li P, Liang L, Zhao C, Qi J, Peng L und Chen Y-H. Spatial heterogeneity of muscarinic type 2 receptors in the atrium. *Int J Cardiol*, 2008; 127(3):427–429.
- Pankuweit S und Maisch B. Das Herz bei viralen Infektionen. *Internist*, 2010; 51(7):836-843.
- Pankuweit S, Richter A, Ruppert V und Maisch B. Classification of cardiomyopathies and indications for endomyocardial biopsy revisited. *Herz*, 2009; 34(1):55-62.
- Pankuweit S, Richter A, Ruppert V und Maisch B. Familial predisposition and microbial etiology in dilated cardiomyopathy. *Herz*, 2009; 34(2):110–116.
- Pankuweit S, Ruppert V und Maisch B. Inflammation in dilated cardiomyopathy. *Herz*, 2004; 29(8):788-793.

- Paul M, Zumhagen S, Stallmeyer B, Koopmann M, Spieker T und Schulze-Bahr E. Genes causing inherited forms of cardiomyopathies. A current compendium. *Herz*, 2009; 34(2):98–109.
- Perrot A, Hussein S, Ruppert V, Schmidt H J, Wehnert M S, Duong N T, Posch M G, Panek A, Dietz R, Kindermann I, Böhm M, Michalewska-Wludarczyk A, Richter A, Maisch B, Pankuweit S und Oezcelik C. Identification of mutational hot spots in LMNA encoding lamin a/c in patients with familial dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*, 2009; 104(1):90–99.
- Petrou M, Galanello R, Traeger-Synodinos J und Old J-M. Best practise guidelines for carrier identification and prenatal diagnosis of haemoglobinopathies. European Molecular Genetics Quality Network www.emqn.org, 2002.
- Retondaro F C, Dos Santos Costa P C, Pedrosa R C und Kurtenbach E. Presence of antibodies against the third intracellular loop of the M2 muscarinic receptor in the sera of chronic chagasic patients. *FASEB J*, 1999; 13(14):2015–2020.
- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarsas I, Martin I und Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 1996; 93(5):841–842.
- Rivero-Ayerza M, Theuns D, Garcia-Garcia H M, Boersma E, Simmons M und Jordaens L J. Effects of cardiac resynchronization therapy on overall mortality and mode of death: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur Heart J*, 2006; 27(22):2682–2688.
- Ruppert V, Meyer T, Struwe C, Petersen J, Perrot A, Posch M G, Ozcelik C, Richter A, Maisch B, Pankuweit S und the German Heart Failure Network. Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for dilated cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet*, 2010; 18(6):694–699.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*, 1977; 74(12):5463–5467.
- Schmitt J P, Kamisago M, Asahi M, Li G H, Ahmad F, Mende U, Kranias E G, MacLennan D H, Seidman J G und Seidman C E. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science*, 2003; 299(5611):1410–1413.
- Schultheiss H P und Kühl U. Stand der Diagnostik und Therapie der inflammatorischen Kardiomyopathie *Internist* 2008; 59(1):7–16.
- Sheffield V C, Beck J S, Kwitek A E, Sandstrom D W und Stone E M. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, 1993; 16:325–332.
- Silbernagel S, Klinker R und Pape H-C. *Physiologie*. Thieme, 2007; 84ff.

Taylor M R G, Slavov D, Ku L, Di Lenarda A, Sinagra G, Carniel E, Haubold K, Boucek M M, Ferguson D, Graw S L, Zhu X, Cavanaugh J, Sucharov C C, Long C S, Bristow M R, Lavori P, Mestroni L, Familial Cardiomyopathy Registry und B.E.S.T. (Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial) DNA Bank. Prevalence of desmin mutations in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 2007; 115(10):1244–1251.

The Criteria Committee of the New York Heart Association. Nomenclature and criteria for the diagnosis of diseases of the heart and great vessels. Little, Brown & Co, 9th Edition ed. Boston, 1994; 253-256.

Tesson F, Sylvius N, Pilotto A, Dubosq-Bidot L, Peuchmaurd M, Bouchier C, Benaiche A, Mangin L, Charron P, Gavazzi A, Tavazzi L, Arbustini E und Komajda M. Epidemiology of desmin and cardiac actin gene mutations in a european population of dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 2000; 21(22):1872–1876.

The Digitalis Investigation Group. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. *N Eng J Med*, 1997; 336(8):525-533.

Tsuga H, Kameyama K, Haga T, Honma T, Lameh J und Sadée W. Internalization and down-regulation of human muscarinic acetylcholine receptor M2 subtypes. role of third intracellular M2 loop and G-protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem*, 1998; 273(9):5323–5330.

van Koppen C J und Kaiser B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther*, 2003; 98(2):197–220.

Voigtländer U, Jöhren K, Mohr M, Raasch A, Tränkle C, Buller S, Ellis J, Höltje H-D und Mohr K. Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M2 receptor that account entirely for the M2/M5 subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in n-methylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol*, 2003; 64(1):21–31.

Vorechovsky Igor. Singel-stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Medical Biomethods Handbook*, 2005; 73–77.

Wallukat G, Fu H M, Matsui S, Hjalmarson A und Fu M L. Autoantibodies against M2 muscarinic receptors in patients with cardiomyopathy display non-desensitized agonist-like effects. *Life Sci*, 1999; 64(6-7):465–469.

Wang J C, Hinrichs A L, Stock H, Budde J, Allen R, Bertelsen S, Kwon J M, Wu W, Dick D M, Rice J, Jones K, Nurnberger J I, Tischfield J, Porjesz B, Edenberg H J, Hesselbrock V, Crowe R, Schuckit M, Begleiter H, Reich T, Goate A M und Bierut L J. Evidence of common and specific genetic effects: association of the muscarinic acetylcholine receptor M2 (CHRM2) gene with alcohol dependence and major depressive syndrome. *Hum Mol Genet*, 2004; 13(17):1903–1911.

Wang Z, Shi H und Wang H. Functional M3 muscarinic acetylcholine receptors in mammalian hearts. *Br J Pharmacol*, 2004; 142(3):395–408.

WHO. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J*, 1980; 44(6):672–673.

Willmy-Matthes Pia, Leineweber K, Wangemann T, Silber R-E und Brodde O-E. Existence of functional M3-muscarinic receptors in the human heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2003; 368(4):316–319.

Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Lech P, Rozek M M und Wodniecki J. Randomized placebo-controlled study of immunosuppression treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two years follow-up results *Circulation* 2001; 104:39-45.

Yoshikawa T, Baba A und Nagatomo Y. Autoimmune mechanisms underlying dilated cardiomyopathy. *Circ J*, 2009; 73(4):602–607.

Zannand F, McMurray J J, Krum H, van Veldhuisen D J, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock S J, Pitt B und the EMPHASIS-HF study group. Eplerenon in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Eng J Med*, 2011; 364(1):11-21.

Zhang L, Hu A, Yuan H, Cui L, Miao G, Yang X, Wang L, Liu J, Liu X, Wang S, Zhang Z, Liu L, Zhao R und Shen Y. A missense mutation in the CHRM2 gene is associated with familial dilated cardiomyopathy. *Circ Res*, 2008; 102(11):1426–1432.

Zhou C, Fryer A D und Jacoby D B. Structure of the human M(2) muscarinic acetylcholine receptor gene and its promoter. *Gene*, 2001; 271(1):87-92.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Klassifikation der Kardiomyopathien nach der American Heart Association.	2
Abb. 2:	Klassifikation der Kardiomyopathien nach der European Society of Cardiology.	3
Abb. 3:	Prävalenz der familiären DCM (nach Frey et al. 2007).	5
Abb. 4:	Signaltransduktion des m2AChR (nach Dhein et al. 2001).	12
Abb. 5:	Prävalenz der familiären DCM im untersuchten Kollektiv.	25
Abb. 6:	Anzahl Patienten nach NYHA-Stadium	26
Abb. 7:	Weitere bekannte Mutationen im untersuchten Kollektiv.	28
Abb. 8:	Erfolgskontrolle der PCR.	29
Abb. 9:	SSCP Laufzeittest.	29
Abb. 10:	Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-1 ohne Mutation.	30
Abb. 11:	Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-2 ohne Mutation.	31
Abb. 12:	Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-3 ohne Mutation.	31
Abb. 13:	Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-4 ohne Mutation.	31
Abb. 14:	Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-5 ohne Mutation.	31
Abb. 15:	Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-6 ohne Mutation.	32
Abb. 16:	Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-7 ohne Mutation.	32
Abb. 17:	Beispiel einer SSCP mit Amplifikaten des Primers CHRM2 3-8 ohne Mutation.	32
Abb. 18:	Nachweis des Polymorphismus C650T in SSCP und Sequenzierung.	33
Abb. 19:	Nachweis der Missense-Mutation G885A in SSCP und Sequenzierung.	34
Abb. 20:	Nachweis der Mutation G1269C in SSCP und Sequenzierung.	35
Abb. 21:	SSCP der Kontrollgruppe mit dem Träger der Mutation G1268C als Positivkontrolle.	36
Abb. 22:	SSCP der Kontrollgruppe mit dem Träger der Mutation G885A als Positivkontrolle.	36
Abb. 23:	Aminosäureaustausch der Mutation G885A.	47
Abb. 24:	Aminosäureaustausch der Mutation G1268C.	48

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Ätiologie der dilatativen Kardiomyopathie (nach Hershberger 2010).	4
Tab. 2:	Einteilung der subjektiven Beschwerden bei Patienten mit Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association.	7
Tab. 3:	Subtypen der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (nach Dhein et al. 2001).	11
Tab. 4:	Datenlage zur Assoziation von Veränderungen im CHRM2-Gen mit klinischen Erscheinungen.	14
Tab. 5:	Verzeichnis der verwendeten Chemikalien.	16
Tab. 6:	Verzeichnis der verwendeten Geräte.	16
Tab. 7:	Primerpaare	19
Tab. 8:	Programm und Prinzip der PCR	21
Tab. 10:	Vergleich der klinischen Daten von Patienten mit sporadischer und familiärer DCM.	27
Tab. 11:	Klinische Daten der Mutationsträger.	37

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AT1	Angiotensin Rezeptor Typ 1
ATP	Adenosintrisphosphat
Bp	Basenpaare
CHRM2	Gen des muskarinergen Acetylcholinrezeptors Typ 2
CRT	cardiac resynchronization therapy
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD-Kamera	Charged-coupled Device Kamera
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerin
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nucleosidtrisphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Gln	Glutamin
His	Histidin
ICD	implantable cardioverter defibrillator
Ile	Isoleucin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Kbp	10 ³ Basenpaare
KHK	Koronare Herzkrankheit

KOF	Körperoberfläche
Leu	Leucin
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVESP	linksventrikulärer endsystolischer Druck
mAChR	muskarinerger Acetylcholinrezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bis-phosphat
Pro	Prolin
RNA	Ribonukleinsäure
RR	relatives Risiko
Ser	Serin
SERCA2a	sarkoplasmatische Retikulum ATPase
SNP	single nucleotid polymorphism
ssDNA	Einzelstrand-DNA
SSCP	single stranded conformation polymorphism Gelelektrophorese
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Val	Valin
VHF	Vorhofflimmern
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

Publikationen

V. Ruppert, F. Straulino, A. Perrot, M. Posch, A. Richter, C. Özcelik, B. Maisch, S. Pankuweit und KNHI „Mutationen im Gen des muskarinergen Acetylcholin-Rezeptors CHRM2 – ein neues Krankheitsgen für familiäre dilatative Kardiomyopathie?“ Vortrag auf dem Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim, April 2010, Clin Res Cardiol 99, Suppl 1

V. Ruppert, F. Straulino, A. Perrot, M. Posch, A. Richter, C. Özcelik, B. Maisch, S. Pankuweit und KNHI „Mutiations in the Gene coding for the M2-muscarinic acetylcholine receptor chrm2, a potential new candidate gene for dilated cardiomyopathy“ Postervortrag bei der Jahrestagung der European Society of Cardiology in Stockholm, August 2010, <http://spo.escardio.org/eslides/view.aspx?eevtid=40&fp=P3825>

V. Ruppert, F. Straulino, A. Perrot, M. Posch, A. Richter, C. Özcelik, B. Maisch, S. Pankuweit und KNHI „Mutiations in the Gene coding for the M2-muscarinic acetylcholine receptor chrm2, a potential new candidate gene for dilated cardiomyopathy“ Postervortrag bei der Jahrestagung des American College of Cardiology in New Orleans, April 2011, JACC 57 (17) E225

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Fabian Straulino
Geburtsdatum: 06. Oktober 1983
Geburtsort: Jugenheim

Schule

August 1990 bis Juli 1994 Bessunger Grundschule, Darmstadt
August 1994 bis Juli 2003 Georg-Büchner Schule, Darmstadt
Juli 2003 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

August 2003 bis August 2004 Zivildienst als Sanitäter beim
Arbeiter Samariter Bund Darmstadt

Studium

Oktober 2004 bis November 2010 Studium der Humanmedizin an der
Philipps-Universität Marburg

Wissenschaftliche Arbeiten:

März 2009 Wissenschaftliche Mitarbeit im kardiologischen Labor der
AG Dr. Ruppert am Zentrum für Innere Medizin
Kardiologie der Philipps-Universität Marburg.

Ärztliche Tätigkeit:

Seit März 2011 Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik III des Klinikum
Hanau

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg: Alter, Aumüller, Aust, Barth, Basler, Baum, Baumann, Bartsch, Bepler, Bien, Brendel, Burbelko, Burchert, Cetin, Czyubayco, Daut, Dersch, Dietz, Dinges, Doll, Donner-Banzhoff, Eberhart, Fendrich, Feuser, Gebhardt, Geks, Görg C., Görg K., Gress, Grimm, Hasilik, Hegele, Hertl, Heverhagen, Höffken, Hoffmann, Hofmann, Holland, Hundt, Jacob, Jerrentrup, Kaiser-Ferenczy, Kalmbach, Kann, Kaufmann, Kill, Klose, Köhler, König, Kohlmann, Kratz, Krüger, Kroh, Kühnert, Kuhn, Kwee, Langer, Lemke, Lill, Lohoff, Lukasewitz, Maisch, McGregor, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Nachtigall, Neubauer, Kanngießer, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Pankuweit, Pega, Petermann, Ramaswamy, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Röhm, Rolfes, Rost, Rothmund, Rüschi, Ruppert, Sattler, Schäfer, Schlosser, Schmidt, Schofer, Schoppet, Schrader, Schu, Seitz, Sesterhenn, Steinfeld, Steiniger, Steinkamp, Skrobek, Ruchholz, Torossian, Vassilou, Vogelmeier, Vogt, Wagenknecht, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wündisch, Wulf, Zentgraf, Zoremba.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. B. Maisch für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der von ihm geleiteten Klinik anzufertigen, die Durchsicht der Promotionsarbeit und Anregungen zu deren Optimierung.

Frau PD Dr. rer. physiol. Sabine Pankuweit danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit sowie für die zur Durchführung notwendigen technischen und finanziellen Mittel. Auch für die Betreuung und kritische Beratung während der schriftlichen Ausarbeitung möchte ich mich bei ihr bedanken. Obwohl ich gegen Ende der Arbeit nicht mehr in Marburg sein konnte, habe ich mich stets gut betreut gefühlt.

Bei Herr Dr. rer. nat. Volker Ruppert möchte ich mich für die geduldige Betreuung vom ersten Tag im Labor bis zur Fertigstellung der letzten Seiten dieser Arbeit bedanken. Er war bei Problemen stets ansprechbar und stand mir mit seiner langjährigen Erfahrung zur Seite.

Aber auch ohne die vielen Kollegen und Kolleginnen im Labor hätten sich mir während der Anfertigung dieser Arbeit sicherlich mehr Hürden in den Weg gestellt. Nicht nur die Mitarbeiter der Kardiologie, sondern aller Arbeitsgruppen der Ebene 0, Flügel Nord des Biomedizinischen Forschungszentrums halfen mir mehr als einmal bei Materialengpässen oder Problemen. Danke!

Meinen Freunden Benjamin, Daniel, Philipp und Matthias, sowie meiner Schwester Ann-Marie danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Nicht genug Danken kann ich meinen Eltern Gaby und Jürgen, die mich von Beginn meines Studiums an nicht nur finanziell, sondern in jeglicher Art und Weise motiviert und unterstützt haben. Ohne sie wäre nicht nur diese Arbeit nicht zustande gekommen, ich wäre auch nicht die Person, die ich heute bin.

Zu guter letzt sei noch meiner Freundin Manuela gedankt. Auch wenn die Arbeit im Labor und am Schreibtisch viel von meiner Zeit in Anspruch nahm, hat sie dies stets akzeptiert und mich zum Weitermachen motiviert, wenn es nötig war.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Molekularbiologisches Screening des CHRM2-Gens bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie“ in der Klinik für Innere Medizin SP Kardiologie unter Leitung von Prof. Dr. med. B. Maisch mit Unterstützung durch PD Dr. rer. physiol. S. Pankuweit ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden als Vortrag im Rahmen des 76. Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Kardiologie im April 2010 in Mannheim veröffentlicht.

Frankfurt, den 01.01.2012

Fabian Straulino